#### ANNALES

DE

### L'INSTITUT PASTEUR

ETUDE DE L'ALLERGIE A LA TUBERCULINE
ET DE L'INFRA-ALLERGIE AUX CORPS BACILLAIRES

DANS LEURS RAPPORTS

AVEC LA RÉSISTANCE ANTITUBERCULEUSE

CHEZ DES COBAYES VACCINÉS

PAR INGESTION DE GROSSES DOSES DE BCG

par L. NÈGRE, J. BRETEY et Mme D. ROY (\*).

(Institut Pasteur)

Dans des publications précédentes [1], nous avons montré que des cobayes vaccinés par injection intradermique ou sous-cutanée de BCG qui ne réagissent plus à la tuberculine mais qui sont encore sensibles aux corps bacillaires complets, conservent la résistance antituberculeuse que présentent les animaux qui sont encore allergiques à la tuberculine après avoir subi la même vaccination.

Nous avons d'autre part constaté que, même après la disparition de la sensibilité aux corps bacillaires, les cobayes vaccinés par injection intradermique ou sous-cutanée de BCG peuvent, dans certains cas, conserver la résistance antituberculeuse qu'ils avaient acquise par cette vaccination.

Dans ces nouvelles recherches nous avons essayé de nous rendre

(\*) Manuscrit reçu le 2 juillet 1959.

compte si des faits semblables pouvaient être mis en évidence chez

des cobayes vaccinés par la voie buccale.

Calmette, Boquet et Nègre [2] ont montré que des cobayes vaccinés par 10 ingestions quotidiennes de 10 mg de BCG, au total 100 mg, ne réagissent à la tuberculine que 45 à 60 jours après cette vaccination et ne présentent une certaine résistance antituberculeuse que vis-à-vis d'une infection réalisée par l'introduction de bacilles tuberculeux virulents par la voie digestive, et non par la voie parentérale.

De même en clinique humaine, les enfants nouveau-nés vaccinés par ingestion de 30 mg de BCG ne réagissent à la tuberculine que dans 30 p. 100 des cas environ et présentent en milieu contaminé une résistance à la tuberculose légèrement inférieure à celle des

sujets prémunis par la voie parentérale.

Aussi avons-nous employé pour ces nouvelles investigations la méthode de A. de Assis, qui a été reconnue plus efficace chez l'homme que celle utilisée en premier lieu par A. Calmette, C. Guérin, B. Weill-Hallé et R. Turpin.

Si la méthode de de Assis a fait l'objet de nombreuses publications en clinique humaine, elle a été peu étudiée dans le domaine expérimental. Gernez-Rieux et ses collaborateurs [3] ont montré le passage du BCG à travers la barrière intestinale chez le cobaye et la souris qui ont absorbé ces germes.

Tout récemment, quatre auteurs soviétiques ont publié les résultats qu'ils ont obtenus dans la vaccination du cobaye par la méthode de A. de Assis. Kagramanov et Markevitch [4] ont signalé que des cobayes qui ont ingéré 5 doses de BCG présentent une résistance presque égale à celle produite par une inoculation sous-cutanée de BCG. R. O. Drabkine et A. I. Soukhodolskaya ont conclu de leurs expériences que l'ingestion trois fois répétée d'une forte dose de BCG donne aux cobayes vaccinés une résistance à une infection virulente d'épreuve semblable à celle qui est conférée à cet animal par la méthode des scarifications cutanées.

#### Expériences.

Nous avons vacciné nos cobayes en leur faisant absorber par la voie buccale 50 mg de BCG à cinq reprises tous les quatre jours, au total 250 mg. Pendant plusieurs mois après leur vaccination, leur sensibilité à la tuberculine a été recherchée par injection intradermique de 0,1 cm³ d'une solution de tuberculine au 1/20. Lorsqu'ils n'avaient pas réagi à cette substance, ou lorsqu'ils avaient cessé de réagir, ils ont été soumis à une cuti-réaction effectuée sur la peau du flanc par un trait de scarification fait au travers d'une goutte de la suspension de bacilles BCG tués par la chaleur, dosée à 75 mg de germes par centimètre cube.

TABLEAU I.

				AL	LERG	E					RESIS	STANCE	ANTITUBE	RCULEUS	E
				Vec	cinės				1	occir	nés			Témoins	
Nº exper.	Nombre de		I.D.		В	CG=tes	81	Délais épreuves	Nom	bre m	oyen t.	Nombre		Lésions	
	cobayes	2-3 m.	5 m	9m	3 m	5m	7m	ebienses	Rate	Foie	Poum.	témoins	Rate	Foie	Poumon
I	6	0				6+		6 m	6	1	7	4		Tubercules confluents.	Nombreux tubercules
п	4	0			4+	2+	0	7 m	3	1	3	4	Tubercules confluents	Tubercules confluents.	Nombreux tubercules
ш	18	1+	0				Í+	7 m	. 3	2	2	15	Hypertrop. Tres nom- breux tuber- cules.	Assez nom- breux fuber- cules.	
IA	7	0	4+	1+				10 m	1	0	0	10	6 cobayes tubercules confluents.	Nombreux tubercules.	Assez nom- breux tuber- cules.
Proporéacti	ortion des	2 %	11%	2%	11%	22 %	2%				,		3 cobayes assez nom- breux tuber- cules.		Quelques tubercules

Dans des délais variables après leur vaccination, les cobayes vaccinés ont été éprouvés, ainsi qu'un nombre égal de témoins, par inoculation sous-cutanée de 0,001 mg de la souche bovine 1099. Tous ont été sacrifiés six à huit semaines après l'épreuve virulente. Quatre séries d'expériences ont été effectuées dont on trouvera les résultats dans le tableau I.

#### Allergie a la tuberculine et aux corps bacillaires.

On peut voir dans le tableau I que, sur 35 cobayes vaccinés par 250 mg absorbés en cinq prises de 50 mg de BCG, 5 seulement ont réagi à la tuberculine, soit 14 p. 100. Chez ceux qui n'ont pas réagi à la tuberculine, 11 sur 28 ont réagi aux corps bacillaires, soit 39 p. 100. Au total, 16 sur 35 ont réagi à la tuberculine ou aux corps bacillaires, soit 45 p. 100.

Au point de vue de l'évolution de l'allergie dans le temps, nous avons constaté que 2 p. 100 des cobayes ont réagi positivement à l'intradermo-réaction à la tuberculine entre deux et trois mois après la vaccination, et 11 p. 100 au cinquième mois. La proportion des réactions positives s'est abaissée à 2 p. 100 au neuvième mois.

Pour ceux qui n'ont réagi qu'aux corps bacillaires, 11 p. 100 avaient une allergie positive trois mois après la vaccination, 22 p. 100 après cinq mois et 2 p. 100 seulement après sept mois.

Aussi bien pour l'infra-allergie aux corps bacillaires que pour l'allergie à la tuberculine, nous n'avons pas assisté à un déclin progressif des réactions positives, mais d'abord à leur augmentation puis à leur diminution.

Il ne semble donc pas s'agir d'un phénomène de désensibilisation, mais de disparition de l'allergie et de l'infra-allergie vers le septième à neuvième mois.

#### RÉSISTANCE ANTITUBERCULEUSE.

Les résultats de nos expériences, consignés dans le tableau I, montrent d'une façon indiscutable l'efficacité de la méthode de vaccination de A. de Assis dans la production de la résistance

antituberculeuse chez le cobaye.

Parmi les cobayes vaccinés et éprouvés par l'inoculation de bacilles de Koch virulents, les lésions des organes étaient si rares que nous avons pu en faire le dénombrement et établir le nombre moyen de tubercules par organe dans chaque expérience. On peut se rendre compte dans le tableau I de la différence énorme qui existait entre les vaccinés et les témoins au point de vue de leurs lésions : quelques unités de tubercules chez les premiers avec des rates de volume normal ; par contre, chez les témoins les rates étaient souvent doublées, triplées ou quadruplées de volume, avec des lésions confluentes ; le foie et les poumons présentaient aussi de très nombreuses lésions. Seuls quelques rares animaux ont été un peu moins atteints.

Cette résistance manifeste a été exactement la même :

- 1º Chez les cobayes vaccinés qui présentaient au moment de leur épreuve virulente une infra-allergie aux corps bacillaires (exp. 1).
- 2° Chez les cobayes vaccinés qui avaient cessé de réagir aux corps bacillaires (exp. 2).
- 3° Chez les cobayes qui (16 sur 18) n'avaient réagi ni à la tuberculine, ni aux corps bacillaires (exp. 3).
- 4° Chez les cobayes qui avaient cessé de réagir à une intradermoréaction à la tuberculine, et chez un cobaye qui réagissait encore à cette dernière (exp. 4).

#### DISCUSSION.

Quelques faits importants doivent être notés à la suite de nos observations.

- 1° La faible proportion des cobayes vaccinés réagissant à la tuberculine et aux corps bacillaires. Il est peut-être possible de l'attribuer en partie à l'âge adulte de nos cobayes, leur intestin étant moins perméable aux bacilles que celui des jeunes animaux.
- 2º La très lente apparition, après la vaccination, de l'allergie à la tuberculine ou aux corps bacillaires.
- 3° Sa faible intensité, puisqu'elle n'a pu souvent être révélée que par les corps bacillaires.
- 4° Sa tendance à la disparition vers le septième à neuvième mois après la vaccination, alors que chez les cobayes vaccinés par scarifications cutanées l'allergie à la tuberculine apparaît plus précocement et plus régulièremnt et qu'elle persiste avec la résistance qui

l'accompagne pendant au moins trois ans, comme nous l'avons démontré.

5° Le fait que, tout au moins pendant les mois qui suivent la vaccination par la méthode de de Assis, les cobaves vaccinés présentent une résistance antituberculeuse semblable à celle qui leur est conférée par la voie parentérale.

6° La démonstration que cette résistance est indépendante de tout état allergique dans le passé ou au moment de l'épreuve virulente.

#### CONCLUSIONS.

Les cobayes adultes vaccinés par ingestion à cinq reprises tous les quatre jours de 50 mg de BCG ont réagi positivement à une intradermo-réaction à la tuberculine dans la proportion de 14 p. 100. et aux corps bacillaires dans la proportion de 39 p. 100, au total

45 p. 100 de réactions positives.

L'allergie vaccinale s'est manifestée tardivement vers le deuxième à troisième mois après la vaccination; elle n'a pu souvent être mise en évidence que par une cuti-réaction aux corps bacillaires, ce qui montre sa faible intensité. Chez les animaux réagissant à la tuberculine comme chez ceux qui n'ont réagi qu'aux corps bacillaires, la proportion des réactions positives a crû jusqu'au cinquième mois, puis a décru entre le septième et le neuvième mois.

Il ressort de nos expériences que, tout au moins entre le sixième et le dixième mois après leur vaccination, les cobaves prémunis par la méthode de A. de Assis présentent une résistance à une infection d'épreuve aussi marquée que celle qui leur est conférée par injection

parentérale de BCG.

Nous avons établi que, chez les cobayes vaccinés par la voie buccale avec de grosses doses de BCG, la résistance antituberculeuse est la même dans les cas suivants : cobayes réagissant à la tuberculine ou avant cessé de réagir à cette dernière, cobayes n'ayant réagi qu'aux corps bacillaires ou ayant cessé de réagir à ces derniers, cobayes n'avant jamais réagi ni à la tuberculine, ni aux corps bacillaires.

Nous apportons donc une nouvelle preuve de la dissociation complète qui existe entre les phénomènes allergiques et les phénomènes d'immunité.

#### SUMMARY

STUDY OF ALLERGY TO TUBERCULIN AND INFRA-ALLERGY, AND THEIR RELATIONSHIPS WITH ANTI-TUBERCULOUS RESISTANCE IN GUINEA-PIGS VACCINATED BY INGESTION OF HIGH DOSES OF BCG.

Adult guinea-pigs have been immunized by ingestion (five times, every four days) of 50 mg BCG: 14 % of them show a positive intradermo-reaction to tuberculin, 39 % to killed BCG, i.e. a total of 45 % positive reactions.

The vaccinal allergy appeared only the second or third month after immunization; it was often demonstrable only by means of a skin-reaction to BCG, being therefore very weak. In animals reacting to tuberculin as in those which react only to BCG, the proportion of positive reactions increased until the fifth month, then decreased between the seventh and ninth month.

The experiments show that, at least between the sixth and tenth month, guinea pigs which have been immunized by A. de Assis' technique present a resistance to challenge infection as high as

that following a parenteral injection of BCG.

The findings prove that in guinea pigs vaccinated per os with high doses of BCG, the anti-tuberculous resistance is the same in the three following cases: guinea pigs reacting or having ceased to react to tuberculin; guinea pigs reacting or having ceased to react to BCG; guinea pigs which never reacted either to tuberculin or to BCG.

The experiments show the complete dissociation existing bet-

ween allergy and immunity.

#### BIBLIOGRAPHIE

[1] Nègre (L.) et Bretey (J.). Bull. Acad. Méd., 1956, 140, 221. — Nègre (L.), Bretey (J.) et Roy (Mme D.). Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95, 253.

[2] CALMETTE (A.), BOQUET (A.) et Nègre (L.). Ann. Inst. Pasteur, 1921, 35, 561; 1922, 36, 625. — Nègre (L.). Ann. Inst. Pasteur, 1935,

54, 697.

[3] GERNEZ-RIEUX (CH.), TACQUET (A.), FABRE (M.), GÉRARD (H.) et Voisin (C.). Ann. Inst. Pasteur Lille, 1953, 6, 94.

[4] KAGRAMANOV (A. I.) et MARKEVITCH (N. M.). Probl. Touberk, 1958, 36, 80.

[5] Drabkine (R. O.) et Soukhodolskaya (A. E.). Probl. Touberk, 1958, **36**, 87.

# ÉTUDE COMPARÉE DES MÉTHODES DE RECHERCHE DES ANTICORPS NEUTRALISANTS PAR LA TECHNIQUE HABITUELLE ET PAR CELLE D'IMMUNO-INACTIVATION DE GARD AVANT ET APRÈS INJECTION DE VACCIN POLIOMYÉLITIQUE INACTIVÉ (\*)

par R. SOHIER, Y. CHARDONNET (\*\*) et J. FREYDIER (\*\*\*).

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon)

Si la méthode habituellement employée pour déceler dans un sérum les anticorps neutralisants, et qui consiste essentiellement à observer la suppression de l'effet cytopathogène après addition à deux tubes de cultures tissulaires d'un mélange du sérum à expertiser et de cent fois la dose de virus capable d'infecter et de léser 50 p. 100 des cellules inoculées (100 DICT $_{50}$ ), peut donner des informations utiles, en épidémiologie et en immunologie, il n'est pas douteux qu'elle manque de sensibilité.

En admettant, comme on le fait conventionnellement, que le sérum ne contient pas d'anticorps si dans chaque tube 100 à 50 p. 100 des cellules ont subi une dégénérescence, il arrive que

l'on néglige un certain effet protecteur.

Le mérite revient à Gard d'avoir proposé [1] une technique qui, en établissant sur des bases différentes, les doses de virus intervenant dans la réaction, les modalités de contact entre le virus et le sérum à expertiser, et en appréciant l'activité résiduelle sur les cellules sensibles du mélange virus-sérum comparée à celle du virus seul, permet d'obtenir une sensibilité beaucoup plus grande qu'avec la méthode de neutralisation habituelle (1).

(\*) Travail effectué pour l'Institut National d'Hygiène (Directeur : professeur Bugnard) avec une subvention de la Caisse Nationale de Sécurité Sociale.

(\*\*) Attachée de Recherches du C. N. R. S.

(\*\*\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1959.
(1) On voudra bien donner au terme « habituelle », que nous adopterons dans ce texte, le sens de « généralement adoptée » ; il correspond à celui de « conventional » utilisé en particulier par Gard dans ses publications.

L'étude qu'a pu faire l'un de nous dans le laboratoire du professeur Gard (2) de la méthode d'immuno-inactivation, initialement mise au point par lui pour le virus de Theiler [1] puis appliquée au virus poliomyélitique [2] (3), nous a incités à rechercher, par ce procédé, les anticorps neutralisant les virus poliomyélitiques dans des sérums prélevés avant et après vaccination par des vaccins inactivés du type des vaccins de Salk.

L'exposé qui va suivre concerne une étude comparative de la méthode « habituelle » de neutralisation et de la méthode d'« immuno-inactivation » pour la recherche des anticorps neutralisant le virus poliomyélitique du type 2. On voudra bien ne voir là qu'une

étude préliminaire.

Si nous nous sommes limités initialement au virus poliomyélitique de type antigénique 2, c'est parce que, d'une part, il a été avancé, à la suite d'un certain nombre d'enquêtes effectuées à l'aide de tests de neutralisation sur souris, puis sur culture de tissus, que les anticorps contre le type 2 pouvaient, dans une certaine mesure, être plus représentatifs que les autres de l'endémie poliomyélitique et des modalités de développement de l'infection inapparente dans une collectivité, et, d'autre part, en raison de la qualité des vaccins inactivés utilisés dont l'antigénicité pour le type 2 était la plus faible.

Cette étude a porté sur 42 sérums recueillis surtout chez des enfants, mais aussi chez quelques adolescents et que nous avions retenus parce que l'épreuve de neutralisation habituelle avait révélé

l'absence d'anticorps neutralisants pour le type 2.

#### MATÉRIEL.

1º SÉRUMS. — Ils étaient prélevés chez des sujets à jeun, avant la mise en œuvre de la vaccination, puis plusieurs semaines (au minimum trois) après la troisième injection de vaccin inactivé de l'Institut Pasteur de Paris, sauf pour quelques enfants, pour lesquels le prélèvement a dû être fait trois semaines après la deuxième injection.

Ils étaient décantés, répartis en tubes bien fermées et congelés

à  $-20^{\circ}$   $-25^{\circ}$  jusqu'à l'emploi.

(2) Nous tenons à remercier le professeur Gard pour l'accueil qu'il a bien voulu nous réserver dans son laboratoire du Karolinska Institutet et pour toutes les informations qu'il nous a données sur ses recherches concernant le phénomène d'immuno-inactivation et ses applications pratiques. Nous ne saurions oublier également l'assistance technique de M<sup>lles</sup> Eva Herrström et Karin Holmgård.

(3) Au cours de la correction des épreuves, nous avons pu prendre connaissance du travail du professeur Gard, relatif à l'application de la méthode d'immuno-inactivation à l'étude de sérums humains. Le lecteur voudra bien s'y reporter (V° Symposium Européen de la Poliomyélite, Madrid, 1958, p. 60. Association Européenne pour la Poliomyé-

lite, édit., Bruxelles, 1959).

 $2^{\rm o}$  Virus. — Deux souches polio type 2 MEF1 (provenant du laboratoire du Dr Syverton), l'une étiquetée 2-34 (DICT $_{50}$ 10–6,5 dans 0,1 ml) qui a été utilisée pour les séries 95 Å, 7 B, 75 B, 80 B, 93 B de notre expérience, tandis que la souche 2-45 (DICT $_{50}$ 10–6,6 dans 0,1 ml) était employée pour nos séries 16 D et 27 D.

3º CELLULES. — Cellules HeLa (provenant du laboratoire du Dr Syverton) entretenues sur milieu de croissance avec hydrolysat de lactalbumine (Nutritional Biochemical Corporation Cleveland, Ohio) dans une solution de Earle avec 0,1 p. 100 de Yeastolate (Difco, Detroit), 10 p. 100 de sérum de poulain et des antibiotiques. Tubes ensemencés avec 30 000 cellules âgées de 4 jours dans un volume de 1 ml et inoculés quatre jours après, alors que le milieu de croissance avait été remplacé par un milieu de survie ayant la même composition que le précédent, mais dans lequel le sérum de poulain était remplacé par 20 p. 100 de liquide amniotique de bovidés.

#### MÉTHODE.

1° EPREUVE DE NEUTRALISATION HABITUELLE. — Elle était effectuée en mélangeant 0,25 ml de sérum pur préalablement inactivé à 56° pendant trente minutes, avec 0,25 ml de virus 2 dilué de telle sorte qu'on ait 100 DICT<sub>50</sub> dans 0,1 ml. Contact d'une heure à la température du laboratoire en agitant plusieurs fois. Répartition dans deux tubes de cultures de cellules de ce mélange à raison de 0,2 ml par tube.

Témoins réalisés avec deux tubes ensemencés avec un mélange d'eau physiologique et de dilution de virus correspondant à 100  $\mathrm{DICT}_{50}$  par

Dans chaque série de neutralisation, on contrôlait la DICT<sub>50</sub> en procédant à un titrage du virus réalisé en introduisant 0,1 de dilution de virus dans des tubes contenant 0,9 de milieu de survie et en procédant à des dilutions de 10 en 10. Chaque dilution était ensemencée dans des séries de cinq tubes. Lecture des tubes à un jour, quatre jours et sept jours, date de la fin de l'épreuve ; considérée comme négative, comme on le fait habituellement, si 50 p. 100 ou plus des cellules sont dégénérées. Le calcul de la DICT<sub>50</sub> était effectué par la méthode de Karber. On pouvait ainsi connaître le nombre de DICT<sub>50</sub> introduites dans l'épreuve. Toute épreuve dans laquelle on constatait une variation de plus de 0,5 unité logarithmique, en plus ou en moins de la valeur moyenne de la DICT<sub>50</sub>, était recommencée. Ainsi, était-il possible d'obtenir une bonne reproductibilité de la réaction, fait que nous avons de très nombreuses fois contrôlé en accord, en particulier, avec Kelly et Dalldorf [3].

2º EPREUVE D'IMMUNO-INACTIVATION (TECHNIQUE DE S. GARD). — Elle était mise en œuvre en mélangeant neuf parties de sérum et une de virus. Pour ce faire, 0,18 ml (ou mieux, si la quantité prélevée nous le permettait, 0,45 ml) des sérums, préalablement inactivés trente minutes à 56°, étaient mélangés à 0,02 ml (ou selon le cas, 0,05 ml) de suspension de virus dilué de telle sorte que 0,1 ml contienne 1 000 DICT<sub>50</sub>.

Le mélange sérum-virus était mis six heures à 37° et une nuit au

réfrigérateur (0-4°).

On procédait alors à des dilutions du mélange sérum-virus à  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , chaque dilution étant ensemencée dans 10 tubes de culture, sous un volume de 0,1 ml.

Parallèlement, il était procédé à un mélange dans lequel le sérum était remplacé par du milieu de survie, placé dans les mêmes conditions, puis dilué à  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et ensemencé comme précédemment. Plusieurs titrages avaient été effectués préalablement pour contrôler que l'on obtenait, à la fin de l'épreuve (ainsi que le demande Gard pour la validité de sa méthode) une dégénérescence de 50 p. 100 au moins des cellules ( $\gg ++$ ) dans les dix tubes, pour la dilution  $10^{-1}$  dans trois tubes au moins, et sept tubes au plus pour la dilution  $10^{-2}$ , et dans aucun tube, ou au maximum, un tube, pour la dilution  $10^{-3}$ .

La lecture était faite après un jour, quatre jours, six jours et

huit jours.

#### RÉSULTATS

Ils sont résumés dans le tableau I, dans lequel sont indiqués successivement : les numéros d'ordre (1) (4) ; les initiales du nom du sujet (2); le résultat de l'épreuve de neutralisation « habituelle » dans deux colonnes, l'une (3) indiquant le nombre exact de DICT<sub>50</sub> introduites dans la réaction contrôlée par le titrage, l'autre (4) le résultat de la lecture à sept jours; le résultat de l'épreuve d'immuno-inactivation d'abord avec le virus seul avec indication successive du nombre de tubes dans lesquels les cellules étaient dégénérées (NTD) (5) sur les trente tubes ensemencés, puis de la DICT<sub>50</sub> calculée selon la méthode de Karber d'après ce nombre et exprimée en logarithme (6); le résultat de l'épreuve d'immunoinactivation pour le mélange sérum + virus avec indication successive du nombre de tubes dégénérés (NTD) (7) et de la DICT<sub>50</sub> calculée et indiquée comme précédemment (8), puis celle exprimée en logarithme (9) de la différence entre le chiffre trouvé pour le virus seul et celui trouvé pour le mélange sérum + virus ; enfin, dans une colonne (10) avec indication globale notée 0 si cette différence est nulle ou inférieure ou égale à 0,5; + si elle est de 0,6 à 0,9: + + si elle est de 1 à 1,4 ; et + + + si elle est égale ou supérieure à 1,5. Dans une colonne (11) séparant cette première partie du tableau de la seconde, est indiqué le nombre d'injections de 1 ml de vaccin anti-poliomyélitique reçues.

Dans la deuxième partie du tableau, sont relevés les résultats trouvés après vaccination. Pour l'épreuve de neutralisation habituelle, comme avant vaccination (colonnes 12 et 13), avec indication soit d'un résultat négatif = 0, soit, si des anticorps étaient

<sup>(4)</sup> Les numéros entre parenthèses correspondent à chacune des colonnes du tableau dans lequel ils figurent également entre parenthèses en tête de chaque colonne.

décelés, du titre de ces anticorps indiqués par P lorsque l'effet neutralisant n'est obtenu qu'avec le sérum pur et par l'inverse de la dilution si cet effet neutralisant persiste avec le sérum dilué (4 pour 1/4, etc.). Dans les colonnes suivantes, on trouvera indiqués les résultats de l'épreuve d'immuno-inactivation après vaccination selon le même ordre qu'avant vaccination (colonnes 14, 15, 16, 17, 18, 19).

TABLEAU I

	_						_								_		_														
e 1 NOM						A C C	I ]	T A P	I	OM								VAC-	1	A	P	RES	V	7 A C	0 1	NAT	ION				
	i	NEUTRA	LIS	MOITA	1		II	-OMUMP	MA	CTIVAT	ION							CIN	1			SATIO				I MMUNO -		ATTON			
	Ī		TUB	LLE	1	VIR			1	V.	IRUS	+ SER	UM.				l	DOSES	ī	HAR	ITU	TELLE	1	VIR		SEUL		IRUS + S	ERUM		
	Ī	DI <sub>50</sub>	1	Résul-	1	NTD	1	DI 50	-1	NTD	1	DI <sub>SO</sub>	1	IM	1	Résul-	1	RECUES	1	DI		Résul		NTD	1	DI <sub>50</sub>			! IM	1 R	Résul-1
				tat					_							tat				30		tat				50		50			tat
! (2)	1	(3)	1	(4)	1	(5)	1	(6)	- !	(7)	1	(8)	1	(9)	î	(10)	ļ.	(11)	ı	(12)	1	(13)	1	(14)	1	(15)	(16)	1 (17)	! (18)	1 /	19) 1
ī	1		1		T		1		-		1		1		1		1		1		T		T		1	1-77	1	1	1	1	
90. F.	1	250	1	0	1	12	1	1,7	1	0	13	< 0,5	1	≥ 1,2	1	++	!	3	1	312	1	4	1		1			1			
. N . OE 1	1	250	1	0	1	12	1	1,7	1	5	1	1,0	1	0,7	ı	+	!	3	!	312	1	P	1		1		t	4	,	1	
PR. M.	!	176	1	0	1	12	1	1,7	1	10	1	1,5	1	0,2	ļ	0	1		ı	330	i	0	1	11	i	1.6	1 14	1 1.9	1 -0.3	1	0 1
OU. A.	ļ.	200	1	0	1	12	1	1,7	1	7	1	1,2	1	0.5	1	0	1	2	1	44	i	0	i	12	1	1 7	1 1	1 0.6	1 -0,5		
f MI. H.	!	44	1	0	1	12	1	1.7	1	13		1.8		- 0.1	i	0		3	ı	250	i	0	į	11	i	1.6	1 0	1 < 0.5	1 1,1	1	** 1
! MU, J.	1	83	1	0	1	1.2	1	1.7	t	2	t	0.7		1.	i	44		0	,	-,-	i		i		i	2,0	1	1 (10)	1 /2 1 1 2		:
! BO. A.	į	83	î	0	ı	12		1.7	1	14	1	1;9	1	- 0.2	ì	0		0	ſ		i		i		ì		t t		,	1	
! PE. J.	1	83	ı	0	ı	12	1	1.7	1	6	1	1.1	1	0.6	ï		,	0			,		i		,		r	1	4	:	
! BR. A.			1	0	1		1	_,	1		1	2,2	1	-,0	1			2		330	1	0	1	11	1	1.6	1 12	1 1.7	! -0,1		0 !
! BE. A.			1	0	1		1		1		-		1		1		,			176	1	0	1	11	1	1,6	1 12		,		
! RE. M.			1	0	1	11	1	1.6	,	18	,	2,3	1	- 0.7	ì	0		7.		330		0	1	11	1			1 ≤0,5	;≯1,1		** !
! VO. P.			ì	0	1	11	,	1,6	1	21		2.6		- 0,7		0 1		2			1	0	1		1	-,-		1 1,7	1 -0,1		0 !
1 CH. J.			í	0	,	11	,	1.6	1	10	,		, ,	0.7	1	0 1		7		330	1	0		11	1	1,6	1 11	1 1,6	1 0	1	0 .
				0	1	14	,	1.9		1	,	1,5	Ċ	012	1	0 !		2		330	1	0	:	11	!	1,6	' >	! 1	1 0,6	!	٠,
! BE. J.			:		1			, .	:			0,6	1	1,3	1	++ !		2		50	1	4	1		1			1	!	!	!
gu. A.			:	0	1	1.4		1,9		10	1	1,5	1	0,4	1	0 1		2		50	I	4	1		1			1	ł	!	
I LA. A.			1	0	:	14	- !	1,9	1	12	1	1,7	3	0,2	!	0 !		2		50	f	4	1		1			1	!	1	
! GU. F.			1	0	I	14	1	1,9	1	8	!	1,3	[	0,6	1	+ [		3	1	500	!	P	1		ļ			1	1	!	
f MA. C.			Ī	0	1	14	!	1,9	!	11	1	1,6	1	0,3	1	0 1		1		500	1		ļ		!			1	1	!	1
! BI. M.			1	0	1	14	!	1,9	1	16	-1	2,1	1 -	- 0,2	1	0 '		3		500	ŧ	P	1		!			1	!	į	
PE. C.			1	0	!	14	!	1,9	1	9	!	1,4	1	0,5	ļ	0 !		3 1		500	1	P	1		!			1	1	!	
I DE. G.		83	1	С	1	14	1	1,9	- 1	16	1	2,1	1 -	- 0,2	!	0 !		5		50	1	P	1		1			1	1	1	
1 BA. J.			1	0	!	18	- 1	2,3	!	11	!	1,6	1	0,7	1	+ !		2		50	!	0	1	16	!	2,31	2	1 0,7	1 1,6	!	+++ ]
! DU. L.	ţ	176	ţ	0	1	18	1	2,3	ļ	5	1	1,0	1	1,3	1	++ 1				50	1	P	1		1			.1	1	1	t
! TO. J.	Ţ	100	1	0	1	18	1	2,3	- 1	0	1.4	0,5	13	1,8	1	+++ 1		2 1		50	1	0	1	18	1	2,3	0	.!≼0,5	1 > 1,8	!	+++ !
! PE. B.	ţ	100	1	0	!	18	1	2,3	1	0	1 :	€0,5	1 3	1,8	I	+++ 1		2 !		50	1	P	1		1			1	1	ţ	!
! BE. M.	İ	280	1	0	ŀ	18		2,3	1	0	1 ;	(0,5	13	1,8	f	+++ 1		3 1		500	1	0	1	18	1	2,3	0	1 < 0,5	1 ≥ 1,8	1 -	+++ !
! AS. A.	1	110	î	0	1	18	1	2,3	!	0	1.	€0,5	1.7	), 1,8	1	+++ 1		2 1		500	1	P	1		1	1		1	1	!	
BR. P.	1	500	!	0	1	18	!	2,3	1	10	1	1,5	!	0,8	î	+ 1		2		500	1	0	l	18	1	2,3	0	! ≤0,5	1 > 1,8	1 -	+++ !
! BU. Y.	!	500	1	0	1	18	f	2,3	Į	7	1	1,2	1	1,1	1	++ [		2 1		500	1	0	1		1	1		1	!	1	1
! JA. B.	1	83	1	0	!	18	!	2,3	!	G	1 :	(0,5	1.	1,8	1	+++ 1		3 !		312	1	P	1		J	1		1	1	!	. !
! CH. J.	1	312	1	0	!		!		1		1		!		į	1		2 1		312	1	0	1	18	1	2,3	1	1 0,6	1 1,7	: .	+++ !
DU. P.			1	0	1	15	1	2,0	ţ	15	1	2,0	1	0	1	0 1		2		500	1	0	Ī	1.5	î	2,0	1	1 0,6	1 1,4	!	++ [
. GA. D.			1	0	!		1		1		1		!		1	1		2 !		312	1	0	1	15	1	2,0	1.3	1 1,8	1 0,2	1	0 !
! CH. Y.			ı	0	ŧ	15	ŧ	2,0	1	1	1	0,6	1	1,4	ŀ	++ 1		3 1		312	l	4	1		1			1	!	1	
BO. P.		78	1	0	!	18	ŧ	2,3	!	21	1	2,6	! -	- 0,3	1	0 1		3 1		198	1 4	6.4	1		1	1		!	1	!	!
! FA. C.		78	1	0	!	16	1	2,3	!	4	!	0,9	!	1,4	1	++ 1		3 1		198	1 (	54	!		1			1	<b>!</b>	!	,
BE. F.		78	1	0	1	15	i	2,3	1	15	1	2.0	ı	0.3	1	0 1		3 1		198	ŧ	0	1	18	1	2,3 1	10	1 1,5	1 0,8		+ 1
. JO. J.		78	1	0	1	12	1	1.7	1	15	-	2,0	1 -	- 0.3	1	0 1		3 1		198	1	0	ŀ	12	1	1,7	1	1 0,6	1 1,1	, ,	++ 1
. CO. M.		78	1	D	,	12	i	1.7	1	12		.1.7	1	0	ı	0 1		3 1		198	1	Ü	1	12	1	1,7 5	0	1 60,5	121,2	1 .	++ 1
! FO. A.	,	78		0	1	12	,	1.7	1	7	1	1,2	1	0.5	1	0 1		3 1		198	1	0	1	12	1	1,7	5	1 1	1 6,7	1	+ 1
! MO. R.	;	78		0	1	12	i	1.7	1	6	1	1,1	1	0.6	1			3 1		198	1	0	1	12	1	1.7 1	0	150,5	1 > 1,2	! 4	++ 1
! BR. N.			3	0	1	12	1	1,7	1	1		0,6	1	1,1	1	++ 1		2 1		160	1	P	1		1			1	1	1	1
1 DR - 25 -	1	100	1	0		12	1	± 9 '	1	1	,	0,0	,		1			- 1			1		1		i			1	1	!	1
:	1		1		1		1				1		1		1			- 1			1		,		,						

On constatera, avant toute interprétation des résultats, que, pour le virus seul, le nombre de tubes dégénérés exigés par Gard a été retrouvé pour 12 épreuves [cas 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 32, 33, 34] (4) alors qu'il était très légèrement inférieur pour 28 cas [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 38, 39, 40, 41, 42] (4) et

très légèrement supérieur pour 18 cas [22, 23, 24, 25, 26, 27, 28,

29, 30, 31, 35, 36, 37] (5).

Mais en calculant la DICT<sub>50</sub> correspondant au virus seul, et exprimée en logarithme, on peut apprécier l'influence du sérum sur le virus et admettre avec Gard qu'une différence  $\geq 0.6$  log. est significative.

Interprétation des résultats. — Une comparaison établie sur 38 sérums prélevés avant vaccination entre les résultats fournis par

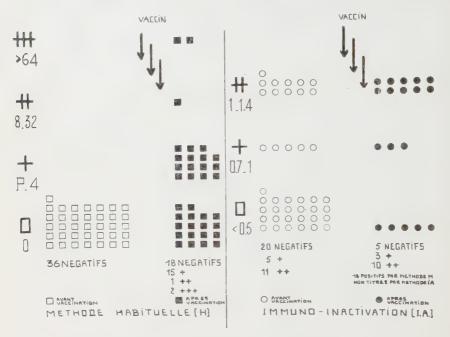


Fig. 1. — Les signes, chiffres et croix, utilisés pour cette figure sont les mêmes que ceux employés pour le tableau I et sont indiqués ci-dessus.

la méthode de neutralisation habituelle [H] (6) et celle d'immunoinactivation IA (7) fait apparaître que 19 d'entre eux contenaient des anticorps pour le virus poliomyélitique type 2 décelables seulement par cette dernière technique. Ainsi, la méthode IA apparais-

<sup>(5)</sup> Pour plusieurs sérums, on doit compter deux titrages, l'un avant et l'autre après vaccination.

<sup>(6)</sup> Lire désormais pour H : habituelle (c'est-à-dire habituellement adoptée).

<sup>(7)</sup> Lire désormais pour IA: immuno-inactivation selon Gard.

sait, comme Gard l'a montré [2], beaucoup plus sensible que la première.

La même comparaison établie pour 36 sérums après vaccination fait ressortir les faits essentiels suivants :

Jugés par la méthode H de neutralisation, 18 sujets sur 36 ont élaboré des anticorps alors que 20 demeuraient négatifs.

Mais sur les 20 sujets négatifs par la méthode H, 15 étaient positifs par la méthode IA, c'est-à-dire avaient des anticorps révélés par elle, tandis que 5 n'en avaient pas du tout.

Ainsi, des vaccins qui pouvaient être considérés comme n'ayant pas provoqué l'élaboration d'anticorps avaient, en fait, une activité antigénique décelée par la méthode IA seulement. Il convenait de préciser le mécanisme de cette élaboration.

Pour ce faire, il était utile de rechercher comment se répartissaient ces sujets positifs après vaccination par rapport à leur état avant vaccination jugé par ces deux méthodes.

On constate que, sur les 18 sujets qui ont acquis des anticorps à un titre décelable par la méthode H, 11 en avaient, en fait, mis en évidence par la méthode IA [donc, n'étaient pas des sujets neufs, n'ayant jamais eu de contact immunisant avec le virus 2] (8). Par contre, 7 paraissaient dépourvus d'anticorps anti-polio 2.

Parmi les sujets dont le sérum contenait, après vaccination, des anticorps décelables seulement par la méthode IA, on notait, avant vaccination, 8 sujets (2 n'avaient pu être titrés) n'ayant pas d'anticorps et 5 qui en avaient, mis en évidence par la méthode IA.

La relation entre la vaccination et l'apparition des anticorps jugés par la méthode IA ressort en particulier dans l'observation 5 du tableau. En effet, cette enfant n'avait pas d'anticorps décelables par aucune des deux méthodes avant vaccination. Dans le sérum prélevé après la deuxième injection, on n'en trouvait pas non plus (les résultats ne figurent pas dans le tableau, ils étaient dans l'ordre adopté, méthode H: 44, 0, et méthode IA: 12, 1,7, 14, 1,9, 0,2, 0) tandis que trois semaines après la troisième injection, on en trouvait, mais seulement par la méthode IA (voir tableau I).

Si l'on groupe différemment les résultats, c'est-à-dire en tenant compte des sujets ayant ou non avant vaccination des anticorps décelables par la technique IA, on constate que sur 20 sujets pouvant être considérés comme non immuns pour le virus 2 avant vaccination (ou « neufs », comme disent parfois les épidémiologistes et immunologistes), 7 avaient acquis, après injection du vaccin, des anticorps révélés seulement par la méthode IA et 5 n'en avaient pas élaboré. On notera qu'aucun des sujets, non immunisés,

(8) Ou les autres virus poliomyélitiques, si l'on admet l'intervention d'une immunité pour des types antigéniques autres que celui ou ceux rencontrés (immunité dite « hétérologue »).

après vaccination, contre le virus 2, n'avaient d'anticorps décelables par l'une ou l'autre méthode avant les injections.

Pour les individus ayant des anticorps que seule mettait en évidence la méthode IA avant vaccination, tous en avaient après vaccination, dont 2 décelables par la méthode II et 5 par la méthode IA seulement.

On sait, depuis la mise en œuvre de la vaccination contre la poliomyélite, qu'il est plus facile d'immuniser contre les trois types antigéniques 1, 2 et 3 des sujets qui ont déjà avant vaccination des anticorps pour un type et mieux encore deux types, que ceux qui semblent complètement dépourvus d'anticorps anti-poliomyélitiques et qui, si l'on préfère, présentent (d'après la terminologie adoptée) les conditions d'une immunisation faite de novo.

Aussi peut-il être de quelque utilité de rechercher dans quelle situation se trouvaient les sujets au regard de l'immunité contre les différents types antigéniques, du moins jugée par la méthode H (9). Les résultats sont les suivants.

Sur les 18 patients dont le sérum titré par la méthode H ne paraissait pas contenir d'anticorps contre le type 2, 7 n'en avaient pas non plus de titrables par la méthode IA. Or, parmi eux, 2 avaient des anticorps pour deux types (1 et 3), 3 avaient des anticorps pour un type (1 ou 3), et 2 contre aucun des trois types antigéniques.

Pour les 11 qui avaient des anticorps contre le type 2, révélés par la méthode IA seulement, 1 avait des anticorps contre deux types (1 et 3), 8 en avaient contre un de ces deux types seulement (1 ou 3) et 2 contre aucun des trois types.

Quant aux cinq sujets qui n'ont jamais eu d'anticorps contre le type 2 décelables par l'une ou l'autre des deux méthodes, avant et après vaccination, ils n'avaient pas d'anticorps non plus contre les deux autres types (1 et 3).

En tenant compte de la présence ou de l'absence d'anticorps avant vaccination, appréciés par la méthode IA, les résultats apparaissent comme suit (V. tableau II).

Sur 20 sujets « neufs » (pas d'anticorps pour le type 2) 14 n'en avaient pas pour les types 1 et 3 en méthode H, 4 en avaient pour un type (1 ou 3) en méthode H, et 2 en avaient pour les types 1 et 3. Quant aux 16 sujets qui étaient avant vaccination immunisés contre le type 2 (décelé par la méthode IA) 6 étaient, examinés par la méthode H, sans anticorps contre deux types

(9) Il n'est pas douteux que la recherche des anticorps pour les types antigéniques, autres que le type 2, effectuée par la méthode IA, aurait un intérêt. Cette recherche a été commencée et les résultats en seront publiés ultérieurement.

TABLEAU II.

Recherche des	Deux ant	et 3)	Un anti (1 o			nticorps	Total
anticorps	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
Absence d'anticorps contre le type 2 par les méthodes H et IA		10	4	20	14	70	20
Absence d'anticorps contre le type 2 par la méthode H. Pré- sence décelée par la méthode IA	1	6,2	9	56,2	6	37,4	16

(1 et 3), 9 avaient déjà un des deux anticorps (1 ou 3) et un seul en avait déjà contre les types 1 et 3 (méthode H).

Ainsi, l'aptitude à l'immunisation, considérée comme nous l'avons rappelé plus haut, comme meilleure chez les sujets ayant déjà des anticorps contre un ou deux types antigéniques (et que certains rapportent à un phénomène dit « d'entraînement » sans

TABLEAU III.

Recherche		ticorps et 3)	Un ant:		Aucun an		Total
anticorps	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Total
A) Sujets avec, avant vaccination, des anticorps pour le type 2 décelables en méthode IA		_					
1) Ayant élaboré des anticorps décelables en méthode H	1	9	8	72,7	2	18,2	11
2) Ayant élaboré des anticorps décelables en méthode la seule- ment			1	20	4	80	5
B) Sujets n'ayant, avant vaccination pas d'anticorps pour le type 2 décelables par la méthode H et par la méthode IA							
1) Ayant élaboré des anticorps décelables en méthode H	2	28,5	3	42,9	2	28,5	7
2) Ayant élaboré des anticorps décelables en méthode IA seule- ment			ı	12,5	7	87,5	8

d'ailleurs bien définir ce qu'ils entendent par là), pourrait tenir, en réalité, à ce qu'ils ont aussi une certaine immunité contre le type pour lequel ils paraissaient, à en juger par la méthode H, réceptifs, immunité que révèle la méthode IA (tableau III).

Présentés sous une autre forme dans le tableau III, les résultats des titrages font apparaître également que, parmi les sujets ayant des anticorps décelables seulement en IA avant vaccination, il y en a une plus grande proportion qui ont des anticorps (décelables en H) pour les types 1 et 3 que parmi ceux qui n'ont d'anticorps décelables quelle que soit la technique utilisée.

En outre, les anticorps, après vaccination, atteignent plus facilement un titre élevé (décelable en méthode H) chez les sujets ayant déjà des anticorps anti-1 ou 3 avant vaccination que chez les autres.

#### Résumé

Les anticorps pour le virus poliomyélitique type 2 ont été recherchés, avant et après vaccination par un vaccin inactivé, d'une part en utilisant la méthode habituelle de titrage des anticorps neutralisants, d'autre part en employant la méthode d'immuno-inactivation de Gard.

Une étude comparée des deux techniques a fait apparaître les faits essentiels suivants :

Sur 38 sérums prélevés avant vaccination, 19 parmi lesquels on ne décelait pas d'anticorps par la méthode habituelle en avaient en fait, mis en évidence par la technique d'immuno-inactivation.

Après vaccination, 20 sujets n'avaient pas élaboré d'anticorps à en juger par la méthode habituelle, alors que l'immuno-inactivation en révélait chez 15 d'entre eux. Cinq n'avaient pas d'anticorps décelables quelle que soit la technique utilisée.

Ces résultats, en confirmant les conclusions de Gard relatives à la plus grande sensibilité de sa méthode, prouvent qu'un pourcentage négligeable de sujets considérés comme « neufs » avant vaccination en les examinant par la méthode habituelle ont déjà, en fait, une certaine immunité; la méthode d'immuno-inactivation révèle d'autre part une certaine antigénicité de vaccins qui en paraissaient dépourvus.

Les résultats obtenus font apparaître également une des raisons pour lesquelles les sujets ayant des anticorps contre un ou deux types antigéniques de virus poliomyélitique élaborent plus facilement des anticorps contre le type contre lequel ils en paraissent dépourvus d'après la méthode habituelle. En effet, la technique d'immuno-inactivation a mis en évidence plus fréquemment chez ceux qui avaient des anticorps contre les types 1 ou 3 ou bien

1 et 3 l'existence d'anticorps contre le type 2, non décelés par la méthode habituelle.

L'étude préliminaire, dont les résultats constituent cette première note, est en cours de développement et apportera peut-être des données d'intérêt pratique pour l'immunologie de la poliomyélite.

#### SUMMARY

Comparative study of the demonstration of neutralizing antibodies by means of the usual technique and by Gard's immuno-inactivation technique before and after injection of an inactivated anti-poliomyelitis vaccine.

The type 2 virus, strain MEF1, has been studied.

1. From 38 sera taken before vaccination, antibodies could be detected in 19 by means of Gard's technique, whereas the 19 sera were negative with the usual method:

2. After vaccination, the results were as follows: From 20 individuals negative with the usual method, 15 were positive with Gard's technique. The other five did not possess any anti-body, whichever the technique.

These results show the greater sensitivity of Gard's technique. They also show that a non negligible percentage of individuals, considered as negative before vaccination, may have a certain degree of immunity. They demonstrate a certain antigenicity in vaccines which did not seem to possess any antigenic capacity.

Gard's technique also reveals the presence of anti-type 2 antibodies (non detected by the usual method) in individuals who possess anti-types 1 or 3, or 1 and 3 antibodies.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [4] Gard (S.). Acta path, microbiol. scand., 1955, 37, 21.
- [2] GARD (S.). Arch. ges. Virusforsch., 1957, 7, 449.
- [3] Kelly (S.) et Dalldorf (G.). Am. J. Hyg., 1956, 64, 243.

# ÉTUDE TECHNIQUE DU DOSAGE BIOLOGIQUE DE L'INH ACTIF, DANS LES HUMEURS, PAR DIFFUSION VERTICALE

par A. TACQUET et F. TISON (\*).

(Institut Pasteur de Lille)

Si le dosage de la streptomycine dans les humeurs n'offre guère de difficultés, grâce à son activité polyvalente permettant l'emploi de germes à croissance rapide, il n'en est pas de même pour le dosage de l'INH.

La plupart des méthodes chimiques évaluent à la fois l'INII libre et les dérivés inactifs sur les mycobactéries [5]; les méthodes physiques présentent les mêmes inconvénients et sont difficilement

applicables en pratique courante.

Les méthodes biologiques sont donc les plus utilisées : elles consistent à observer le comportement d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis* vis-à-vis, d'une part, d'une gamme étalonnée d'INH en milieu liquide et, d'autre part, de dilutions variables du liquide organique à étudier. La lecture tient compte soit de l'arrêt de la végétation, soit de la perte de l'acido-résistance, soit de la non-formation de cordes [1-4].

Une nouvelle technique biologique, d'une grande simplicité et à la portée de tout laboratoire, a été proposée par Grosset et Canetti [2]. Froyez et Galland proposaient déjà dès 1948 [3] d'utiliser la diffusion verticale sur milieu de Löwenstein pour étudier la résistance de souches inconnues vis-à-vis de concentrations connues de streptomycine. Grosset et Canetti proposent, au contraire, après Schmiedel, de déduire du comportement de bacilles tuberculeux de sensibilité connue les concentrations d'INH dans les humeurs.

Le but de ce travail est d'étudier les différents facteurs mis en jeu dans ces techniques : souche d'étude, milieu de culture, technique d'ensemencement, solvants de l'INH, temps d'étuvation, etc.

<sup>(\*)</sup> Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1959.

#### A. — Souche utilisée.

Les différentes souches, sensibles à l'INH, se comportent très

différemment dans ces techniques de diffusion.

Il est naturellement nécessaire, pour obtenir un arrêt net, de disposer d'une culture homogène, sans mutant résistant. Nous verrons, à propos du facteur « temps », qu'elle doit être entraînée à pousser rapidement.

Le BCG présente ces qualités, et peut être, en outre, utilisé

sans risque.

Si le sujet, comme c'est souvent le cas, reçoit, en outre, un sel de streptomycine, il importe de disposer d'une souche résistante à cet antibiotique qui, présent, serait une cause d'erreur par excès.

Le PAS, en prises buccales, peut selon le conseil de Grosset et Canetti, être neutralisé en ajoutant à 1 ml du produit à étudier,

0,05 ml de solution de PAB à 2 mg/ml (1).

Mais les taux énormes de PAS obtenus après une perfusion intraveineuse interdisent alors une mesure sure.

Le biologiste devra en outre se mésier des autres antibacillaires

qui pourraient, à son insu, être pris par le sujet.

La première expérience, mentionnée dans la figure 1, permet déjà quelques constatations pratiques : selon la technique proposée à la fin de ce travail, nous avons étudié le comportement de différentes souches :

A: BCG;

B: BCG streptomycino-résistant (100 μg/ml);

C: Souche humaine streptomycino-résistante (50 µg/ml);

D: H37Rv:

E : Souche humaine streptomycino-résistante, réputée sensible à l'INII mais avec mutants résistants,

vis-à-vis de 1 ml de solution aqueuse contenant différents mélanges [trois tubes de Löwenstein-Jensen, chaque fois] (fig. 1).

1° La souche BCG donne une réponse précoce, nette, bien fidèle, sur les trois tubes.

La lecture peut se faire le neuvième jour.

2º Une petite dose de streptomycine ne modifie pas la zone d'inhibition, mème pour une souche sensible. Les effets se superposent « en épaisseur », non « en hauteur » (A-D). Ce qui ne dispense pas d'utiliser une souche de BCG streptomycino-résistante.

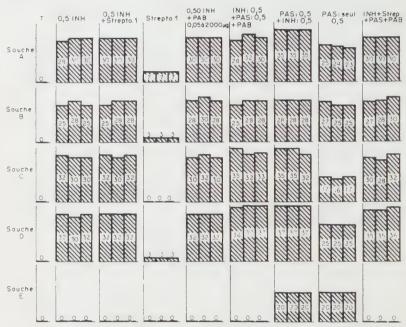
3° Le PAB est efficace, comme le montrent les essais avec la souche E (streptomycino- et partiellement INH-résistante) : l'étude

(1) Nous obtenons, au prix d'une manipulation simplifiée, le même résultat en dédoublant la culture liquide de BCG servant d'inoculum avec une solution saturée stérile de PAB.

de cette souche montre que la présence de mutants résistants (l'ensemencement étant très riche) empêche une lecture valable.

4° Un excès de PAB ne nuit pas.

En conclusion, la souche *BCG* streptomycino-résistante est, en présence de PAB, la plus indiquée. Nous verrons qu'une culture du cinquième jour sur milieu liquide de Dubos représente l'inoculat optimum.



Fr. I. Dans les cases, la hanteur d'inhibition est figurée pour chaque tube.

#### B. — MILIEU DE CULTURE.

Sa première qualité (nous le verrons au chapitre D) doit être de laisser pousser régulièrement et rapidement le BCG. En dehors du Löwenstein-Jensen, le milieu de Dubos gélosé a été essayé. La gélose semblait, en effet, devoir mieux se prêter à la diffusion aqueuse.

- 1° ETUDE DE LA DIFFUSION : comparaison des zones d'inhibition provoquées par une solution d'INH sur les deux milieux.
- a) Par disques : des disques de papier spécial, imprégnés de solution d'INH de concentration croissante (de 0.125 μg à 1 μg/ml), ont été déposés sur des boîtes de Legroux garnies des deux milieux

à étudier, ensemencées la veille par le BCG. L'auréole d'inhibition a été plus grande sur le milieu de Jensen que sur le milieu de Dubos à concentration égale. Mais cette inhibition, irrégulière et peu différenciée selon la concentration, se prète mal à la mesure. Elle fait renoncer à l'idée d'adapter cette technique à la pratique.

Nous avons constaté que l'INH ne se comporte pas comme les colorants imprégnant les disques : ceux-ci diffusent plus loin sur

milieu de Dubos que sur milieu de Jensen.

b) Verticalement : 1 ml de solution contenant 0,5 µg d'INH a été déposé à la pipette dans le fond de six tubes verticaux : trois de milieu de Dubos gélosé, trois de milieu de Jensen. Ces six tubes avaient, la veille, été ensemencés régulièrement avec du BCG.

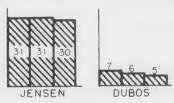


Fig. 2.

Au dixième jour d'étuve, la zone d'inhibition était nettement

lisible (fig. 2).

La différence, très sensible, intéresse particulièrement l'INH, puisque la même expérience faite avec de la dihydrostreptomycine donne les résultats représentés dans la figure 3.



Fig. 3.

#### 2° Comportement particulier de l'INH.

a) Sur milieu liquide: le milieu de Dubos proprement dit ne peut être accusé d'inhiber l'INH. Sur milieu liquide, en effet, la sensibilité à l'INH est même un peu plus élevée sur Dubos que sur Youmans, dans les mêmes conditions.

	T	0,005	0,01	0,015	0,02	0,03	0.04
		one of the last of			_		
Y	++	++	++	++	++	+	0
D	++	++	++	++	0	0	0

b) Action de la gélose : 2 ml de solution d'INII contenant 10 μg d'INH ont été portés à l'étuve cinq jours, en présence de :

1° 12 cm³ de milieu de Jensen;

2º 12 cm³ de milieu de Dubos gélosé;

3º 12 cm³ de gélose sans Dubos.

Le dosage de l'INH résiduel a été pratiqué le sixième jour dans la portion de liquide récupérée par aspiration.

La concentration mesurée sur milieu liquide [1] s'est révélée

êlre :

Jensen 1,6 à 3,2  $\mu g$ . — Gélose 1,6 à 3,2  $\mu g$ . — Dubos gélosé 4 à 10  $\mu g$ .

L'INH n'est donc pas détruit mais « stoppé » sur le Dubos gélosé, alors qu'il se « dilue » dans les deux autres milieux.

Ces premières données soulèvent un problème intéressant qui sera étudié par ailleurs. Mais, dès maintenant, il apparaît que le milieu de Jensen laisse bien diffuser l'INH et se prête à une technique courante.

Comme y insistent Grosset et Canetti, il faudra choisir, pour toutes les mesures et les témoins, des tubes bien calibrés, du même lot de fabrication, contenant le même volume de milicu, selon la même inclinaison.

#### C. — INFLUENCE DU SOLVANT.

Nous verrons que la référence précise au témoin est une des qualités de cette technique. C'est pourquoi nous avons recherché

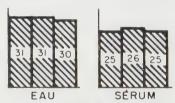


Fig. 4.

l'influence de la différence de solvant entre le témoin et le produit biologique étudié (sérum sanguin par exemple).

#### 1° INFLUENCE SUR LA DIFFUSION.

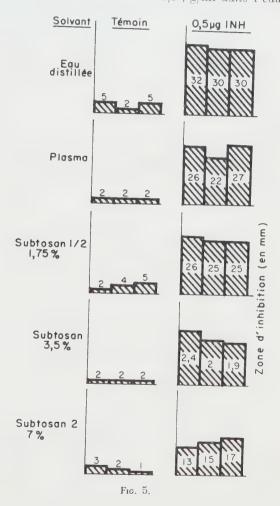
a) Essai avec disques : sur gélose ordinaire, en boîte de Petri, les désinfectants usuels diffusent mieux et plus loin en solution aqueuse qu'en solvant « sérum ». La zone d'inhibition du staphylocoque en témoigne, en particulier pour le merfène au 1/16 000 (écart de 10 mm).

L'anneau visible de diffusion des colorants révèle des écarts

importants dans le même sens.

Il n'est donc pas étonnant que sur milieu de Jensen, la diffusion de l'INH à partir de disques imprégnés d'eau donne une zone d'inhibition du BCG plus grande qu'à partir de disques imprégnés de sérum à la même concentration.

b) Essai vertical : dans les mêmes conditions que ci-dessus (B, 1°), un essai vertical a été fait sur six tubes de Jensen : Trois avec une solution d'INH à 0,5  $\mu$ g/ml dans l'eau ;



Trois avec une solution d'INH à 0,5 µg/ml dans le sérum. L'influence du solvant est nette et régulière. La diffusion est plus grande avec l'eau qu'avec le sérum (fig. 4). c) Comparaison avec le subtosan. La tableau suivant montre la zone d'inhibition relative correspondant à 0,5 µg d'INH dans des solvants variables. Le subtosan dilué à 50 % semble jouer, dans ce cas particulier, le même rôle que le plasma humain (fig. 5).

#### 2º INFLUENCE SUR L'INII LUI-MÈME.

La diffusion ne paraissant pas le seul facteur en cause, un essui comparatif a été fait sur milieu de Youmans. Un même inoculum a été ensemencé sur des tubes contenant des doses croissantes d'INH. Seul le solvant des solutions différait.

La lecture donne des écarts sensibles.

	T	0,005	0,01	0,015	0.02	0,03	0,01
			_				
Eau	++	++	+	0	0	0	0
Sérum	++	+++	+++	+++	++	0	0

La première conclusion qu'on puisse tirer de cette étude est que les solutions témoins doivent être préparées avec le même solvant que le produit pathologique (sérum le plus souvent), tant pour les dosages en milieu liquide que pour les mesures par diffusion.

#### D. — Influence du temps d'étuve en fonction du solvant.

Deux séries de douze tubes de même lot de fabrication ont été

préparées.

Chaque série verticale, en dehors d'un tube témoin, a reçu 1 ml de solution d'INH à 0.50 µg, solution dans l'eau pour la série A, solution dans le sérum pour la série B, et a été portée à l'étuve.

0,05 ml d'une culture de BCG de 4 jours (sur milieu liquide de Dubos) a été déposé sur le haut du milieu de Jensen et s'est écoulé verticalement sur la ligne médiane de la surface utile, le premier jour pour le tube témoin et le tube n° 1, le troisième jour pour le tube n° 2, le cinquième jour pour le tube n° 3, et ainsi de suite jusqu'au vingt et unième jour d'étuve.

Les tubes étaient retirés de l'étuve, pour lecture, le dixième jour après l'ensemencement de BCG (soit donc du dixième au

trente et unième jour).

Première constatation: l'arrêt de la végétation sur la coulée d'ensemencement est net, de lecture facile.

Deuxième constatation : la zone d'inhibition a été plus grande d'emblée avec le solvant « eau » qu'avec le solvant « sérum ».

La différence s'est ensuite rapidement accrue avec le temps pour arriver, avec l'eau, à ce que la zone d'inhibition dépasse la hauteur du milieu.

Avec le sérum, les écarts de diffusion ont été moins grands, et rapidement suivis d'une régression de la zone stérile. Si l'ensemencement est fait après le dix-septième jour, des colonies apparaissent sur tout le milieu, même dans la partie inférieure, et la lecture devient impossible (fig. 6).

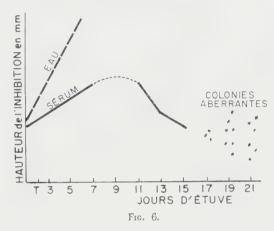
Ceci confirme les précédentes constatations :

1° Il convient d'utiliser une souche de croissance rapide. Le séjour prolongé à l'étuve fausse le résultat, et ceci en fonction de plusieurs facteurs variables.

2º Les témoins doivent se faire avec le même solvant que la

mesure.

3° L'ensemencement vertical par « coulée » est satisfaisant et



simple. L'arrêt de croissance est très nettement lisible. L'ensemencement se fait dans le même temps opératoire que la répartition des solutions, d'où premier gain de vingt-quatre heures. La lecture après cet inoculat riche et vivace peut se faire le dixième jour d'étuve.

#### E. — Technique proposée.

C'est pour la concentration de  $0.5 \mu g/ml$  que la zone d'inhibition est la plus facile à lire, et la plus fidèle (20 à 30 mm selon les conditions).

C'est pourquoi il convient, par dilution, de se rapprocher le plus

possible de ce taux probable.

1° Etablir dans le même solvant que le produit à étudier une gamme témoin. Par exemple : 0,125, 0,25, 0,5 et 1 μg/ml.

2º Diluer le sérum (ou autre produit stérile) en une gamme à

étudier. Par exemple : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

3º Déposer à la pipette, directement dans le fond d'un tube de

L'evension-Jensen vertical. I mi des solutions : temoin et liquide biologaque a etabler al est preferable de faire plusieurs tubes pour chaque concentration : 3 par exemple).

el Faire couler ét. 6 mil d'une culture de BCG dans les conditions incrutes 2 : à aguidonner. Porser : ern culciment à l'etuve, et lire le

diviente par en plus teri.

Les hauteurs d'invibition des mbes temoins portees en ordonnée et les concentrations en abscisse donnéeront une courbe de réference, permortain de doducer les concentrations d'INH dans le produit biologique enuire.

#### 

Il s'acut fluire methode climique approximative. La precision ne peut rivaliser avec les données des mothodes effectuees en milieu liquide 1. Par course, la lecture est ici « continue » :

Le saix d'inhérition, obtenu par les methodes en milieu liquide, se same eutre deux concentrations, tant pour les tubes temoins que pour le desage effectue sur les humeurs. Il en resulte une myrecesson dans le taux qui se sime, par exemple, entre 1.6 et 3.2.

Pans la methode par diffusion. Il est, par contre, fait référence à une courée commune. L'emploi d'un même solvant pour les temems compense, en aure, l'improcesson relative de cette methode.

Il est fait appel, lors de la lecture, à la movenne des hauteurs findubition de trois subjes : une manipulation correcte entraîne une execulente fiéclite de la mothode pour tous les tubes d'une fillation Source.

Cette technique, encore perfecuble, est à la porrée de tout laboratture et permet d'intenir, en dix jours, des resultats « cliniques » interessants en pratique courante.

#### Tale Nil.

L'ennée systematique de différents facieurs, nature de la souche CINR, temps d'incubation, conduit les auteurs à proposer une methode de diffusion verticale permettant la lecture en dix jours.

#### 5. WW 131

FEVENCE STOPS OF ACTIVE INH ASSAY IN BODY FLUIDS.

Viter having studied various factors (nature of strain and culture 1995), and the results within ten days.

2 Chilture sur Pubes hedomblee par la solution de PAR.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Grosset (J.), Grumbach (F.) et Canetti (G.). Ann. Inst. Pasteur, 1957, 92, 752.
- [2] GROSSET (J.) et CANETTI (G.). Rev. Tub., 1958, 22, 1077.
- [3] FROYEZ et Galland. Journées de Pneumophtisiologie infantile, Lille, 1948.
- [4] Canetti (G.) et Grosset (J.). Rev. Tub., 1958, 22, 778.
- [5] GROSSET (J.), CANETTI (G.), THIBIER (R.), VIVIEN (J. N.), LEPEUPLE (G.) et Saenz (A.). Rev. Tub., 1958, 22, 202.

#### ÉTUDE D'UNE SOUCHE DE FLAVOBACTERIUM, AGENT INFECTIEUX D'UNE ÉPIZOOTIE CHEZ LES CARPES

par J. MEYER, J. MALGRAS, Ch. ROMOND et C. BOEGLIN (\*).

(Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Strasbourg)

Le germe en question a été isolé à partir de fragments de cœur, de viscères malades, ainsi que de prélèvements de vésicules cutanées fermées (1). Nous avons eu recours au milieu de Hiss liquide, en effectuant des gammes de culture par ensemencement progressivement dilué. Finalement, nous avons employé des cultures àgées de 24 heures, qui ont été dispersées au moyen du séparateur de germes de Hauduroy sur des milieux de Hiss gélosés coulés en boîtes de Petri, pour obtenir dans les premières vingt-quatre heures des colonies séparées. A partir de celles-ci, nous avons isolé notre germe en culture pure, après contrôle par l'examen morphologique au microscope.

Pour l'étude des caractères biochimiques, nous avons employé les techniques indiquées par Sartory et Meyer [1] et Brisou [2]. A titre de comparaison, nous avons appliqué les mêmes méthodes à un certain nombre de Pseudomonadacées qui nous ont été gracieusement fournies par différents chercheurs. Nous donnons dans le tableau I les résultats de nos expériences faites avec notre souche, avec Pseudomonas punctata 29 et 43 de Schaeperclaus, puis avec Ps. viridiflava 53 de Londres et Ps. fluorescens I. P. 30.

En examinant le tableau I on se rend compte que les deux derniers germes, c'est-à-dire Ps. viridiflava et Ps. fluorescens, se différencient nettement des trois autres. Ce fait ressort déjà des caractères macroscopiques culturaux; il y a lieu d'insister particulièrement sur le fait que les trois premiers germes sont monotriches et à pigment jaune non hydrosoluble, alors que les deux autres sont pluritriches et élaborent un pigment diffusant dans le milieu ambiant, lui donnant un aspect fluorescent. Mentionnons également la différence de la température culturale, qui est de 37° pour le premier groupe et de 27° pour le second. Nous n'insistons pas ici sur le pigment, puisque nous aurons l'occasion d'y revenir ultérieurement.

Nous tenons à donner cependant notre technique de coloration des cils, vu la discussion qui existe à ce sujet, surtout chez les

<sup>(\*)</sup> Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1959.
(1) Voir Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 413.

TABLEAU I.

Contrôle			Souches:		
	Carpe		Pseudomonas	1	
	-	punctata 29	punctata 43	viridiflava 53	fluorescens3
		Etude morpholo	gi:ue		
Mobilité	+	+	1 +	+	
Cils	m	112	m	pl	+ pl
Température	370	370	370	270	250
Gélatine	+L	+L	+L	+L	+L
Gélose	lisse	lisse	filament.	lisse	rugueuse
Bouillon T	V+U+	V+T+	V+T+	T+D+	T+D+
Bo.illon viande Lait	V+D+	V+T+	V+T+	T+D+	T+D+
Pigment	C-Ac- jaune	C-Ac- jaune	C+Ac+ jaune	C+Ac+	C+Ac+
Anaérobiose 37º	+G	+G	jaune +	fluorescent	fluorescent
Anaérobiose 25°	+	+	Ť	† +	_
Anaérobiose colonies	lentic.	lentic.	lentic.	sphériques	-
		Fergentation	les Glucides		
Glucose 37°	+G	+G	+6		
Glucose 27°	+G	+G	+0		_
Lévulose 37°	+	+	1	_	-
Lévulose 27°	+	+	+	<u>+</u>	+
Galactose 37°	+9	+ G	+G	_	_
Galactose 27°	+	+	+	_	-
Saccharose 37°	+3	+ G	<b>‡</b> G	-	-
Saccharose 27°	+	+	+	_	-
Maltose 37° Maltose 27°	+G	+ G +	+G +	_	
Lactose 35°	+	+	<u> </u>	±	±
Lactose 27°		_	_	_	+
Mannite 37º	+ G	+G	+G	_	
Man.ite 27°	+G	+	+	_	_
Arabinose 37° -	+G	+17	+	-	_
Arabinose 27°	+	+	+	+	-
Adonite 37º	-	-	-	-	_
Adonite 27° Dulcite 37°	-	-	-	-	-
Dulcite 27°	+	<u> </u>	+	-	-
Rhamnose 37°	+	+	±		-
Rhamnose 27°	+	±	±		_
Tréhalose 37º	+G	+G	+G	_	_
Tréhalose 27°	+G	+G	+	-	_
Inositol 37°	-	-	-	~	-
Inositol 27°	-	-	-	-	-
Salicine 37°	+ G	-	+G	-	-
Salicine 27° Glycérine 37°	+6		<u>*</u>	-	-
Glycérine 27°	+15	+G +	-	+	
		Vilieu de Hi	sa glucosé à	370	
Acidification	+	+	+		
Coagulation	+	+	+		
Peptonisation	=	-	-		
		intres cara	tères hinchim	ianes	
Acétylméthylcarbinol	+	+	+	4	
12S	+	+	+	_	_
ndole	+	+	+	_	
louge neutre	+	+	+		+
itrates en Nitrites	+	+	+	-	+
itrates en Ammoniaque	+	+	+	-	+
litrates en Azote	-	-	-	~	+
rée	_	-	~	-	-
itrate	+	-	-	+	+
CN cide phénylpyruvique	_	†	+	-	, ,
eree busuarthandrandas				*	7

 $<sup>\</sup>begin{array}{lll} m = monotriche\;;\;\; pl = pluritriche\;;\;\; L = liquéfaction\;;\;\; V = voile\;;\;\; D = dépôt\;;\;\; T = trouble\;;\;\; C = coagulation\;;\;\; Ac = acidification\;;\;\; G = production\;de\;gaz. \end{array}$ 

auteurs allemands. Notre méthode est une modification de celle de Zettnow.

1º Préparation du mordant. — Dissoudre 2 g d'antimonio-tartrate acide de potasse dans 50 cm³ d'eau distillée. Chauffer doucement en agitant pour activer la dissolution. Verser 25 à 30 cm³ de cette solution dans 200 cm³ d'une solution de tanin à 5 p. 100 dans l'eau distillée, de façon qu'au refroidissement le mélange soit à peine lactescent.

2º Préparation de la solution d'éthylamine argentée. — Préparer une solution saturée de sulfate d'argent, puis mélanger :

Solation de	sulfate d'	'argent	 	$5~\mathrm{cm^3}$
Eau distillée				$5 \text{ cm}^3$

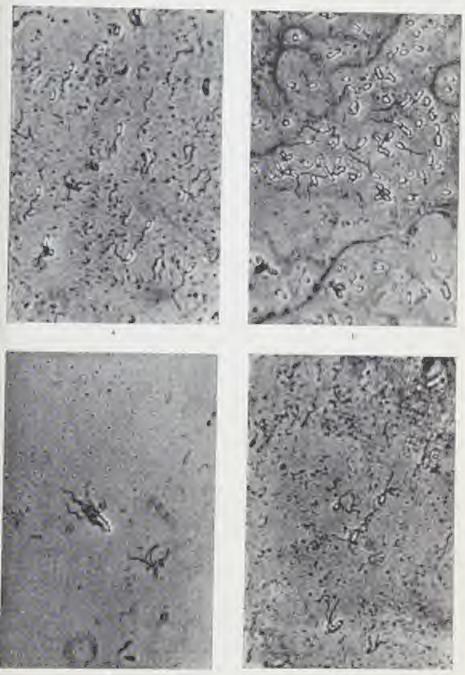
Ajouter goutte à goutte une solution d'éthylamine à 33 p. 100 jusqu'à ce qu'il reste une légère opalescence. Ne préparer ce réactif qu'au moment de l'emploi.

Mode opératoire: Employer une culture sur gélose âgée de 20 à 24 heures. Introduire dans un tube à hémolyse 1 cm³ d'eau distillée stérile. Déposer en surface, sur les bords du tube, une anse de culture. Laisser les bactéries se répartir uniformément dans le liquide placé à 37° pendant trente à soixante minutes. Après ce temps, ajouter dans le liquide une goutte de la solution d'acide osmique à 2 p. 100 et laisser agir quinze à trente minutes, ou même davantage, à 37°. Préparer une pipette Pasteur effilée et légèrement recourbée à l'extrémité qui doit être franchement coupée.

Prélever un peu de liquide surnageant opalescent et le déposer en fines gouttelettes sur une lame parfaitement propre, en appuyant la pipette sur la lame (ne pas laisser tomber la goutte). Mettre à sécher à l'étuve à 37°. Fixer à la chaleur et placer la lame dans le mordant presque à l'ébullition. Laisser faire un bouillon et retirer de la flamme. Abandonner le tout jusqu'à début de trouble (ne pas laisser trop longtemps pour éviter la formation d'un précipité sur la lame; pour l'éviter il suffit de tourner le frottis vers le bas).

Sortir ensuite le frottis du mordant, le placer horizontalement et le recouvrir d'eau à l'aide d'un jet de pissette. Laver très soigneusement. La lame restant horizontale, la recouvrir de l'éthylamine argentée en couche épaisse. Chauffer doucement avec la veilleuse d'un bec Bunsen jusqu'à émission franche de vapeur, que l'on doit maintenir pendant cinq à dix minutes. Ne pas laisser la solution d'éthylamine se concentrer trop, en rajouter si nécessaire. Rincer soigneusement la lame restée en position horizontale ; on chasse l'éthylamine argentée d'un jet de pissette, la lame étant encore chaude. On contrecolore pendant deux minutes avec le violet de gentiane phéniqué. On lave à l'eau. Sécher à l'air et examiner à l'immersion.

Fig. 1 — Microphotographics de 4 Pseudomonas montrant les cils. Grossissement 1 000 × en contraste de phase : a) Flavobacterium punctatum (carpe) ; b) Pseudomonas aeruginosa ; c) Ps. viridiflava 53 ; d) Ps. fluorescens.



REMARQUE: Il est très important d'utiliser des lames neuves, n'ayant jamais servi. Les laver soigneusement à l'eau et au détergent; bien les rincer et les placer vingt-quatre heures dans une solution de permanganate de potasse à 5 p. 100. En les sortant, les rincer très soigneusement et les placer dans un mélange d'acide sulfurique à 1 p. 100 et d'acide oxalique à 1 p. 100; les laisser quelques heures, mais pas trop longtemps, puis les rincer et les mettre dans de l'eau distillée jusqu'au moment de l'emploi. A ce moment, les retirer et les essuyer entre deux papiers filtres.

L'exécution rigoureuse de cette technique est nécessaire, d'après nos propres expériences, pour réaliser des colorations impeccables des cils. Nous reproduisons des microphotographies concernant les quatre souches.

On voit ainsi que notre germe se différencie nettement par son caractère de monocilié (comme Ps. aeruginosa), alors que Ps. viri-

diflava 53 est bicilié et Ps. fluorescens pluricilié.

La différence entre nos Flavobacterium et les Pseudomonas se manifeste encore d'une façon très marquée par leurs propriétés enzymatiques vis-à-vis des glucides. On voit en effet que Ps. viridiflava et Ps. fluorescens ont un pouvoir de fermentation très réduit ; elles n'attaquent que le glucose, le lévulose et le maltose. Notons encore que Ps. fluorescens est le seul parmi nos cinq germes à attaquer le lactose.

Par contre, le pouvoir de fermentation glucidique des trois souches du premier groupe est assez marqué. Tout d'abord il faut insister sur la fermentation de ces corps ternaires avec production de gaz, phénomène qui ne se manifeste en général qu'à 37°. Les divergences de vues qui existent au sujet de cette fermentation des sucres entre les différents auteurs, pourraient résulter des cultures effectuées à 27° par les uns, à 37° par les autres, ce qui a pour effet de donner des résultats variables pour un même germe. Il importe donc de cultiver systématiquement chaque souche aux deux températures. La production de gaz à partir d'un sucre semble ainsi dépendre essentiellement de la température optimum de croissance de ces organismes et ne peut pas être considérée comme un caractère fixe.

En comparant les trois souches entre elles, nous voyons que le seul caractère différentiel est l'attaque de la salicine par notre germe et par Ps. punctata 43 Schaeperclaus, alors que Ps. punctata 29 ne dégrade pas ce corps dans nos expériences. Ps. punctata 43 se différencie des deux autres par le fait qu'elle acidifie et coagule le lait, comme le font également Ps. viridiflava et fluorescens. Dans notre tableau, nous avons seulement indiqué les résultats obtenus sur milieu de Hiss glucosé; or, ceux obtenus pour les autres sucres ne correspondent pas toujours : ainsi nous avons constaté que la peptonisation s'effectuait plus rapidement et

d'une façon plus intense dans les milieux au maltose, à la mannite, au saccharose et au galactose en ce qui concerne notre souche isolée de carpes. Pour ce qui est de Ps. punctata 29 et 43, nous n'avons pu observer aucun phénomène de peptonisation sur le milieu glucosé; par contre, il se manifeste d'une façon assez intense pour les deux bactéries sur milieu à la mannite et au maltose. Ps. punctata 29 exerce aussi une légère protéolyse sur le milieu à base de saccharose. On voit que ces trois organismes se rapprochent également à ce point de vue et que la différence entre nos souches fraîchement isolées et les souches de collection provient peut-être d'une perte de pouvoir protéolytique (enzymes d'adaptation) de ces dernières au cours des repiquages successifs.

En ce qui concerne les autres caractères biochimiques, on remarque également que nos cinq bactéries se scindent en deux groupes : Ps. viridiflava se caractérise par ses réponses négatives aux différents contrôles ; la seule propriété positive de ce germe est sa capacité d'employer le citrate de soude comme unique source de carbone ; il a cette qualité en commun avec Ps. fluorescens, alors que les trois premiers germes sont incapables d'utiliser ce sel seul dans leur métabolisme glucidique. De plus, Ps. fluorescens et viridiflava se séparent des trois autres souches par leur incapacité de produire de l'H<sub>2</sub>S et de l'indole. Ps. viridiflava se distingue de Ps. fluorescens par le pouvoir réducteur, qui est très prononcé chez cette dernière, puisqu'elle réduit aussi bien le rouge neutre que les nitrates en nitrites, ammoniaque et azote. Les germes du premier groupe produisent également, à partir des nitrates, des nitrites et de l'ammoniaque, mais non de l'azote.

On voit ainsi que ces trois germes se différencient de Ps. fluorescens et de Ps. viridiflava, à la fois par leurs propriétés morpho-

logiques, culturales et biochimiques.

Il semble ainsi possible que certains auteurs allemands, parlant de l'instabilité et de la faculté de mutation de Ps. punctata, aient travaillé avec des mélanges de souches; quant à nous, nous confirmons la conception de Schaeperclaus sur les caractères fixes des Ps. punctata, agents essentiels de la maladie infectieuse des carpes.

Une autre propriété, d'une importance majeure pour la systématique de ces Pseudomonadacées, est leur pouvoir chromogène. Brisou se base sur ce caractère pour établir la taxinomie de ces germes. Nous avons pu constater qu'il s'agit d'un pigment caroténoïde, et nous reviendrons sur son isolement et son rôle dans une publication ultérieure.

D'après Brisou, notre souche est à classer dans son groupe

Flavobacterium hydrophilum.

Les caractères morphologiques, biochimiques et chromogènes de notre organisme, le rapprochent de la souche décrite par Zimmermann en 1890, à laquelle cet auteur avait attribué le nom de Bacillus punctatus [3], ce qui pourrait permettre d'identifier notre germe à l'espèce Flavobacterium punctatum, ses caractères étant indéniablement ceux d'un Flavobacterium. Les raisons pour lesquelles on peut malgré tout pencher vers la dénomination de Flavobacterium hydrophilum tiennent à ce que les auteurs modernes possèdent des procédés d'investigation plus poussés que ceux utilisés par Zimmermann en 1890; d'autre part, nous avons tout intérêt à la simplification de la taxinomie, vu la grande confusion existant actuellement dans la famille des Pseudomonadacées.

Nous croyons avoir ainsi pu apporter une contribution utile à l'étude taxinomique des Pseudomonadacées et au problème de

l'infection œdémateuse épidémique de la carpe.

#### Résumé.

Les auteurs ont isolé, lors d'une épizootie chez les carpes, un Flavobacterium qui en était l'agent infectieux. Ils comparent ce microorganisme avec différentes autres Pseudomonadacées, en prenant en considération les principes taxinomiques de Brisou. Ils insistent principalement sur les divergences de vues existant au sujet des propriétés biochimiques et pigmentaires de ces Pseudomonadacées, afin de clarifier la question de taxinomie des Pseudomonadacées. Ils ont élaboré une technique de coloration des cils, permettant de prendre en considération ce caractère morphologique pour la classification de ces germes.

#### SUMMARY

STUDY OF A STRAIN OF Flavobacterium, AGENT OF AN EPIZOOTIC DISEASE IN CARPS.

In the course of an epizootic disease in carps, the authors have isolated a Favobacterium, which was the cause of the disease. They compare this microorganism with other Pseudomonadaceae following Brisou's taxinomy. They point out the different opinions on the biochemical properties and pigmentogenesis of these of these Pseudomonadaceae. They describe a staining technique allowing to use the flagella for the classification of these germs.

#### BIBLIOGRAPHIE

[1] Sartory (A. et R.) et Meyer (J.). Microbiologie pratique, Maloine, édit., Paris, 1950.

[2] Brisou (J.). Etude de quelques Pseudomonadacées. Classification, A. Baillet, édit., Bordeaux, 1956.

[3] ZIMMERMANN (O. E. R.). Die Bakterien unserer Trink- und Nutzwasser, 1<sup>re</sup> partie, p. 38, Chemnitz, 1890.

## CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES PROTÉINES DES MYCOBACTÉRIES (\*)

par J. DESBORDES, F. PERCHERON, Marie-Thérèse FAYET et J. BLOMET (\*\*).

(Ecole pratique des Hautes-Etudes, Paris : Laboratoire de Chimie neurologique, Section de Biochimie microbienne [Directeur adjoint : J. Desbordes] ; Centre Hospitalier E.-Roux, à Brévannes [Service du Dr Jean Paraf et Laboratoire de Biochimie, F. Percheron, pharmacien-chef] ; Laboratoire de Recherches Vétérinaires à Lyon [Service Physico-Chimie, Mie M.-T. Fayet].)

On sait depuis longtemps que les Mycobactéries, en particulier les bacilles tuberculeux, sont riches en matières protéiques et que celles-ci paraissent bien engagées au sein de la cellule bactérienne en de très gros édifices (macromolécules) contenant lipides, protides et osides. La nature de ces macromolécules, dès que l'on tente de les isoler, est très influencée par le mode d'extraction. De plus, il paraît certain que leur composition et leur proportion relatives se modifient avec la nutrition du bacille et son milieu nutritif, ce qui entraîne des variations en relation avec la composition du milieu et le temps de culture.

L'étude des protéines bacillaires peut être envisagée de différentes manières. On peut les extraire à partir des corps bacillaires : méthode délicate à mettre en œuvre, conduisant à l'obtention de débris plus ou moins dénaturés. On peut aussi les étudier hors de la cellule en partant du postulat qu'on peut les faire exsuder facilement. On peut les examiner par le moyen de l'analyse physico-chimique, ou par celui de leurs propriétés biologiques. On peut suivre aussi la nutrition azotée des Mycobactéries.

De ce fait, deux sources de matières premières sont couramment utilisées : la purée bacillaire d'une part, la tuberculine d'autre part.

Quelle est la composition des protéines tirées du bacille de Koch? Il semble qu'elle ne soit guère originale et que celles-ci contiennent tous les amino-acides banaux trouvés dans toute protéine micro-

(\*\*) Manuscrit reçu le 7 juillet 1959.

<sup>(\*)</sup> Travail subventionné par l'Institut National d'Hygiène (professeur Bugnard).

Tableau I. — Amino-acides isolés à partir du bacille de Koch, comparés avec ceux de quelques protéines naturelles, zéine du maïs, caséine du lait, gliadine du blé, albumine du sérum de cheval (en p. 100).

	7 1	TO SO THE STOCKED TO SELECT	Series Trans		00 (		Références	305	
Auteura	: Campball : Jonhson & : Brown (42)	Stacey 1950	: Pauletta : 1952	Beldwin & s	Lederer :	Mess	1 Whobse 1 (1ad't)	Ble,	. Chavel
Ac.diamino-pimeli-s NH3	1	D +		1933	+				
Clandan		-	• ••		00 00	3,6	1,61	 rv	1,2
	be 60	‡	‡		•• •	0	0	1 0,68	0
Alamino	** **	‡	‡		+	3,8	1,5	1 2,66	3 2.7
Valine	60 00	‡	‡		04 04	1,9	7,2	3,34	
Threonine	04 00	+			94 00	0	0	0	0
Leucine	99 00	‡	‡		ee ee .	25	7,9	1 6,62	20.6
Isoleucine	** **	‡	‡	• •• •	11 00 (	0	1,4	1	. 0
Phenylalanine :	** **	+		0 00 0	M 00 €	7,6	3,2	2,60 :	3,1
Tyrosine	+ (1%):	** **		9 99 94	19 60 C	5,6	4°5	2,37 :	2,1
Serine	66 60	64 64	+	00 0	* ** *	r	0,5	; 0,13 ;	9.0
PTOLITIE	** **	+			• •• •	6	6,7	13,22	1,04
Hydroxyproline :	**	0		• ••	oo oo	0	0	1	Ċ
Ac.aspartique :	* ** 4	, be (	+	‡	64 66	1,8	7.4	1,29	) k
Acide glutamique :	+(3%):	+	+	‡	+	31,3 8	15,5	43,60	7.7
Cystine		+1		00 00	** **	0,75	0.23 **	7.17	
Methionine ;	+1	+	60 GG	** **	** **	0	L.		7 (
Arginine	+ (10%) ::	‡	+	‡	**	8	, co	v	o
Lysine	(%) +	‡	+	- 00 0		, }	C 67	2,40	4,4
Histidine	(%)+	00 4			00 00	·· ·	2,5	1,21 :	13,2
• ••	· · ·		00 00	+	**	8,0	5,9	N	3,4
Tryptophane :	+110000					•			

bienne. On peut essayer de dresser un tableau des amino-acides isolés par les auteurs dont il convient de rappeler les travaux

(tableau I) [2, 3, 5, 9, 10, 12, 16, 24, 25, 31, 32, 35, 36].

D'autre part si nous tentons de dresser un tableau de la composition du principe actif ou des substances trouvées responsables de l'activité tuberculinique, semblable à celui que nous avons dressé pour les amino-acides du BK, nous obtenons le tableau II, d'après divers travaux [1, 3 bis, 15 à 18, 23, 27 à 33].

Tybeleau II. — Amino-acides isolés à partir de diverses tuberculines : (A) très actives ; (C) moins actives.

Proteines tuberculiniques							
	SEIBERT, KENT(pré cipité tri chloracé- tique)	(urée) :	STACEY & LLOYD	KASUYA,	KASUTA		
NH3		++ /					
Glycine(glycocolle)	+	++	++		++		
Alanine	+ 1	+(lié:			++		
Valine	+	ac.glutam):  ++(C):			++		
Thréonine			+	0 0	+		
Leucine		<u>+</u> ++(C) :	++		+		
Isoleucine		+ ++(C):	++				
Phénylalanine	+	+ ++(C):	+				
Tyrosine	+		_				
Serine					+		
Proline		++ :	<u>+</u>		+		
Acide Aspartique	++		+++	:	++		
Acide glutamique	++ :	+(lié :	+++	:	+++		
Cystine	+ :	analine) :	<u>+</u>	:	++		
Méthionine ;		•	<u>+</u>		+		
Arginine	+	++ :	+++		++		
Lysine	+ :	++ :	+		++		
Histidine	9 6 6	***	+				
Tryptophane	+ (A)	*		,	+		
non identifié :	+ (C)	0 0	+++		+		
(aldéhyde crotonique)	.e) :	0 0		+ :	,		

Nous avons envisagé, pour notre part, l'examen des protéines des

Mycobactéries, en étudiant la composition de la tuberculine.

Certes l'école de Fl. Seibert [30] a démembré d'une façon magistrale, grâce à la technique électrophorétique, la tuberculine en divers constituants. Il a été vérifié que des fractions chimiquement différentes étaient bien séparables et contenaient respectivement des acides nucléiniques (les plus rapides), des protéines plus ou moins pures, et des polysaccharides (les moins rapides). De plus l'école américaine a montré que l'activité tuberculinique était localisée dans la fraction protéinique. De notre côté avec Hirtz et M<sup>110</sup> Fayet [7], grâce à l'électrophorèse en amidon, nous avons divisé les tuberculines de différentes origines en quatre fractions principales : acides nucléiniques, protéines de grande mobilité, protéines de moindre mobilité et glucido-protéines, dont seule la fraction 3 (protéine de mobilité faible) est active, ce qui confirme les résultats de l'école américaine.

Cependant, nous avons pensé qu'il serait intéressant de reprendre ces expériences avec nos techniques, et si possible d'y apporter quelques précisions et de contribuer ainsi à la connaissance des

protéines des Mycobactéries.

# PARTIE EXPÉRIMENTALE

# A. — Techniques.

1º ELECTROPHORÈSE SUR AMIDON. — L'électrophorèse est faite en cuve horizontale dans un tampon véronal-acétate (pH 7,7, force ionique =

0,15) immobilisé par des grains d'amidon.

La cuve est constituée par une plaque de verre de  $100 \times 9$  cm, sur les bords longitudinaux de laquelle sont fixées à la silicone, l'une sur l'autre, deux lames de plexiglass de  $100 \times 1 \times 0.4$  cm et  $100 \times 1 \times 1$  cm. La suspension d'amidon (préalablement lavé) dans le tampon est coulée. Après décantation, l'excès de liquide est absorbé, les deux réglettes supérieures de  $100 \times 1 \times 1$  cm sont enlevées et l'amidon en excès raclé, de sorte que les dimensions finales du bloc d'amidon sont  $100 \times 7 \times 0.4$  cm. La solution à analyser est placée à 20 cm de la cuve cathodique en une zone transversale de 0.5 cm de largeur, également fixée par l'amidon. On recouvre le bloc d'une feuille de chlorure de polyvinyl.

L'électrophorèse est pratiquée à une température constante :  $-2^{\circ}$ , avec un gradient de potentiel de 5 V/cm et une intensité de 7 mA/cm<sup>2</sup>

de section, pendant quarante-huit à quatre-vingt-seize heures.

Après l'électrophorèse, chaque bloc est découpé en 100 tranches de

1 cm, éluées chacune dans 3 à 5 ml de tampon.

Habituellement, trois blocs d'amidon ont été placés en parallèle : le premier destiné aux dosages chimiques, le deuxième permettant une mesure comparative des lipides, le troisième réservé aux dosages biologiques. Un dosage de protéines sur les trois blocs permet de vérifier l'exacte correspondance des trois électrophorèses.

Dans les parties aliquotes des éluats du premier bloc, on dose colorimétriquement les protéines par la méthode de Lowry, Rosebrough, Farr et Randall [19], les glucides par l'anthrone ou l'a-naphtol [34], l'acide ribonucléique par la technique de Dische [8]. Dans le deuxième bloc, les lipides sont colorés spécifiquement au Noir Soudan B dans la solution soumise à l'électrophorèse, selon une technique dérivée de celle de Mac Donald et Bermes [20], ce qui ne gêne en rien leur migration. Après élution, on les mesure colorimétriquement. Enfin, le troisième bloc, élué dans une solution de NaCl à 9 p. 1 000 stérile, permet d'isoler diverses fractions dont l'activité biologique est déterminée par réaction sur le derme de cobayes ou chez l'homme.

2º Hydrolyse des fractions tuberculiniques lyophilisées. — 30 mg de chaque fraction lyophilisée sont portés à l'ébullition à reflux pendant deux heures avec 3 ml d'acide chlorhydrique au demi.

On laisse en contact pendant vingt heures à la température du laboratoire.

Ensuite, on évapore à sec, sous vide, au bain-marie, en ajoutant à deux reprises, un mélange de 1,5 ml de benzène et 1,5 ml d'acétone, pour entraînement azéotropique de l'acide chlorhydrique.

On maintient encore trente minutes sous vide, au bain-marie, pour éliminer parfaitement l'acide.

Le produit d'hydrolyse est dissous dans 1/2 ml d'eau distillée et on obtient ainsi une solution légèrement jaunâtre qui servivra aux chromatographies sur papier.

 $3^{\circ}$  Chromatographie bidimensionnelle sur papier. — Conditions opératoires :

Chromatographie ascendante sur papier Arches 302.

Solvants: Première dimension: phénol fraîchement distillé, saturé d'eau, le mélange étant ensuite saturé de ligroïne pour éviter sa coloration. Au fond de la cuve: NH, à 3 p. 100.

Deuxième dimension : mélange de Partridge : n-butanol/acide acétique/eau (4-1-5) [on prend la phase solvant].

Dans tous les cas le papier a été maintenu vingt-quatre heures dans les cuves, pour équilibrage, en atmosphère saturée des vapeurs des solvants et d'eau, avant l'introduction de la phase solvante mobile.

Durée du développement : vingt heures.

Température: 19 à 20°.

Les hydrolysats des diverses fractions tuberculiniques furent déposés sur un coin des feuilles de papier (à 3 cm des bords), au moyen de pipettes capillaires délivrant en moyenne 3 mm³ pour une tache de 6 à 8 mm de diamètre.

La révélation des spots d'amino-acides fut réalisée par pulvérisation sur le papier d'une solution de ninhydrine à 0,1 p. 100 dans le n-butanol et à température ordinaire. La réaction colorée atteint son maximum d'intensité en vingt-quatre à vingt-six heures.

4º Titrace des fractions (sur cobayes et sur l'homme). — Le titrage sur le cobaye a été fait très simplement sur des cobayes sensibilisés

grâce au bacille H37Rv, avec des dilutions de tuberculine témoin contenant dans 1/10 de millilitre, 5, 10 et 20 U. I. injectées en intradermoréaction au flanc droit épilé et des dilutions sous 1/10 de millilitre de la solution à tester, injectées de la même façon au flanc gauche épilé. On procède à la lecture des résultats dès la trentième heure, puis les deuxième et troisième jours pour apprécier des réactions tardives. On mesure le diamètre de la réaction inflammatoire, on l'exprime en millimètres et on détermine quel taux de l'échantillon entraîne des réactions équivalentes à celles produites par l'une ou l'autre des doses de la tuberculine témoin. On éprouve, si besoin est, quelques cobayes sensibilisés, avec diverses dilutions de la solution à tester, de façon à préparer des dilutions donnant une zone réactive d'environ 10 à 12 mm.

Le titrage sur l'homme se fait par intradermo-réaction par comparaison avec une tuberculine témoin.

### B. - RÉSULTATS.

La tuberculine servant de base à ces travaux a été préparée très classiquement sur milieu de Sauton, puis a subi une précipitation trichloracétique. La tuberculine ainsi purifiée, qui contenait environ 80 mg de protéine par millilitre, a été soumise à l'électrophorèse en amidon très poussée, de telle façon que les fractions inactives d'acides nucléiniques soient éliminées par migration les faisant sortir de l'amidon, et que les fractions protéiniques actives soient largement étalées sur la bande d'amidon.

Par ce moyen, on a recueilli quatre fractions protéiniques qui ont été immédiatement lyophilisées, mises en ampoules et conservées à la glacière.

Chaque ampoule a été reprise au moment du besoin par 2 ml d'eau distillée.

1° Composition chimique brute. — Sur chaque fraction, on a procédé à une estimation, comme il est exposé plus haut, des protéines, des acides nucléiniques, des glucides, des lipides et du phosphore correspondant grossièrement aux phospholipides (1). L'hydrolyse a permis l'appréciation en amino-acides totaux.

De ce fait on peut dresser la courbe ci-jointe, qui révèle les

quatre fractions isolées (fig. 1).

Indépendamment de la composition qualitative de ces fractions, nous pouvons dès maintenant faire ressortir que les fractions II et III sont beaucoup plus riches en amino-acides que les fractions I

(1) Sur chaque fraction les protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique et le précipité épuisé par ébullition par le mélange alcool-éther. Sur cet extrait on dose le phosphore, les taux trouvés, extrêmement faibles, de l'ordre du  $\gamma$  ne révèlent pas jusqu'ici de différences significatives entre les trois fractions.

et IV, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment, montrant que les fractions I et II sont proportionnellement plus riches en substances que nous avons qualifiées « lipidiques », comme étant adsorbées par le Noir Soudan.

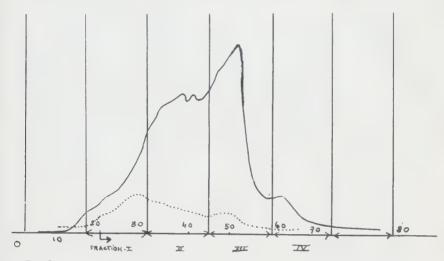


Fig. 1. — Tracé électrophorétique de la tuberculine examinée : protéines, trait plein ; substances fixées par le Noir Soudan (lipides ?), trait pointillé. Chiffres de 0 à 80 : découpage centimétrique. Chiffres romains : fractions isolées : I à IV.

TABLEAU III. - Analyse des surfaces de la courbe de la fig. 1.

Fraction	Détail de la fraction protidique	Détail de la fraction lipidique
1	12,76 %	43,75 %
11	40,80 %	42,60 %
111	38,50 %	13,65 %
IA	7,90 %	
	Détail des pourcentages respectifs dans la fraction protidique	Détail des pourcentages respectifs dans la fraction lioidique
1	9,74 %	6,21 %
11	31,01 %	6,07 %
111	29,37 %	1,94 %
17	6,01 %	0

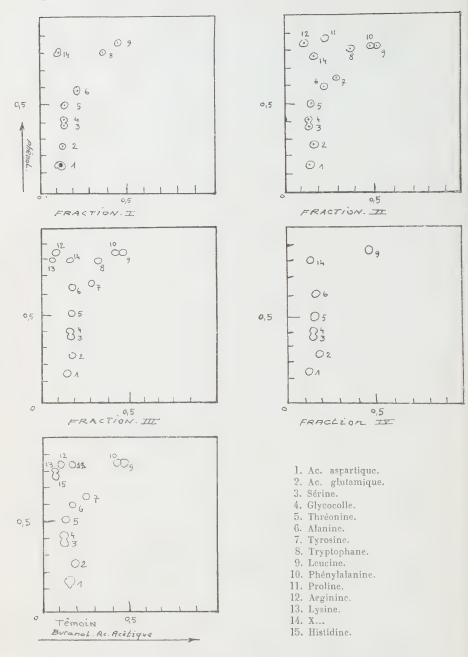


Fig. 2. — Chromatogramme des quatre fractions tuberculiniques.

M. Jean Delaville, que nous remercions ici, a bien voulu pratiquer l'intégration mécanique par la méthode de Simpson pour analyser les surfaces de la courbe, ce qui a donné les résultats rapportés dans le tableau III.

2º Résultat de la chromatographie. — Les chromatogrammes ont révélé, pour les quatre fractions de tuberculine étudiées, des compositions en amino-acides sensiblement superposables. Nous donnons ci-dessous un schéma (fig. 2) de ces chromatogrammes, et un tableau (tableau IV) des divers amino-acides détectés, portant les valeurs moyennes des Rf mesurés; pour chaque fraction, la présence de chaque amino-acide est indiquée par une croix. Des chromatographies témoins, réalisées dans les mêmes conditions avec un mélange des amino-acides considérés, ont donné des chromatogrammes parfaitement superposables à ceux obtenus à partir des hydrolysats chlorhydriques (fig. 2).

Tableau IV. — Amino-acides isolés à partir des quatre fractions tuberculiniques.

Amino-acides	Rf me	Rf mesurés			Présence dans les fractions			
	Phénol/Eau	Mélange de Partridge	1	: 11	1111	17		
Ac.aspartique	0,17	0,14	+	: +		+		
Ac.glutamique	: 0,26	0,17	: +	+	. + :	+		
Sérine	0,36	0,13	: +	: +	+ :	+		
Glycocolle	: 0,42	0,13	: +	. +		+		
Thr&onine	0,51	0,15	: +	: +		+		
Alanine	0,60	0,21	: +			+		
Tyrosine	: 0,62	0,32	: :	. +				
Tryptophane	: 0,79	0,36	: +	. +	: + :			
Leucine	: 0,84	0,49	: +	: +	+ :	+		
Phénylalanine	0,83	0,45	p 6	: +	:tache;			
Proline	: 0,85	0,16		: +	:faible			
Arginine	0,85	0,09	1	+	: + :			
Lysi ne	: 0,80	0,05			: + ;			

<sup>&</sup>amp; - La phenylalanine et le prine ont pu être mises en évidence dans la fraction 11, en effectuant la première phase de la chromatographie en l'absence d'ammoniaque.

Il est à noter que, des trois amino-acides bibasiques, seules

l'arginine et la lysine semblent être présentes.

Par contre, auprès de ces deux acides, nous observons, dans tous les chromatogrammes, une tache de Rf respectifs, 0.79 pour le phénol et 0.12 pour le mélange de Partridge, dont nous n'avons pas encore élucidé la nature (fig. 2), mais qui est probablement de l'acide  $\alpha$   $\omega$ -diamino-pimélique (tableau IV).

3° TITRAGE SUR LE COBAYE. — Nous avons pratiqué le titrage sur le cobaye, ce qui nous a donné les résultats suivants, après dilution, de façon à obtenir des réactions inflammatoires de 10 à 12 mm de diamètre.

Fraction	1	0,1 ml	contenant	approx.	5	U.I.
Annesere	2				10	U.I.
	3				17	U.I.
production.	4				2,5	U.I.

4º Essai biologique des fractions chez l'homme. — La tuberculine de base titrant 80 mg de protéine totale p. 1 000 (moyen grossier d'apprécier sa concentration), a été diluée au 1/40 afin de l'abaisser approximativement à une teneur normale en se basant sur le fait qu'une tuberculine titrant 100 000 U/ml, contient en général 2 mg de protéine par millilitre.

Les fractions obtenues par électrophorèse ont été employées après

dissolution dans 2 ml d'eau distillée.

Nous avons testé un certain nombre de malades tuberculeux, cliniquement allergiques à la tuberculine, du Service du D<sup>r</sup> Jean Paraf au Centre Hospitalier E. Roux à Brévannes. Le tableau V résume l'un de nos essais.

### DISCUSSION

### I. — Composition en amino-acides.

Il ressort de nos expériences que la fraction électrophorétique classiquement active de la tuberculine, c'est-à-dire la fraction protéique, peut être divisée, plus ou moins arbitrairement, en sousfractions grâce à une électrophorèse poussée. Ces fractions présentent incontestablement des différences d'activité biologique sur les sujets tuberculeux (homme et cobave dans nos essais).

La composition chimique totale montre des différences essentielles grossières : teneur variable en protéines totales, présence d'un indosable que nous avons qualifié de substance lipidique parce qu'il est adsorbable par les colorants classiques des lipides. Cependant l'étude fine des amino-acides après hydrolyse dans ces conditions expérimentales ne permet pas de trouver une différence

TABLEAU	V.	-	Titrage	des	quatre	fractions	tuberculiniques
sur l'homme.							•

Malades N°	:Tuberculine mère :diluée au 1/40	:	Fra	ctions	:: :Tuberculine témoin :	
	contenant 2 mg. de proteine au mi	1 2 3 4		4	: 100.000 U.I./ ml	
1	27 mm.	:7mm.	:14mm	27mm:	4111111	7 mm.
2	7,2	0	:4,5	7	0	4,5
3	27	:7	: 14	; 15 :	4,5	7
L <sub>+</sub>	27	:7	: 14	: 15 :	4,5	14
5	27	:7	: 7	27 :	0	7
6	15	: 7	: 4	15 :	4,5	7
7	15	: 7	: 15	7 :	0	<u>L</u>

visible. Toutes les fractions présentent pratiquement les mêmes amino-acides, et il ne semble pas que ce soit dans la nature des amino-acides qu'il faille chercher une différence chimique signant l'activité d'une tuberculine. Un certain nombre d'auteurs avaient attiré l'attention sur les protéines riches en dérivés phénoliques, fait repris par Fl. Seibert en 1950 [30], comme nous l'avons souligné plus haut.

Par exemple, Kallos en 1933 [14] avait émis l'hypothèse d'un parallélisme entre l'activité tuberculinique et la teneur en tryptophane des préparations. Mais Fornbach et Rollier en 1940 n'ont pas confirmé cette opinion, montrant qu'il n'y avait aucune relation entre l'intensité de la réaction de Millon (tyrosine) et l'activité tuberculinique des fractions purifiées.

Rien dans nos recherches ne permet de lier l'activité tuberculinique à une teneur quelconque en amino-acide phénolique.

Tout récemment Fl. Seibert [28] insistait, en étudiant les antigènes de la tuberculine à l'aide de la technique de diffusion en gélose, sur leur multiplicité. C'est bien ce que nous pouvons dire; mais la différence d'activité doit donc être recherchée dans d'autres substances que les amino-acides, sans que nous puissions préjuger, bien entendu, de leur arrangement moléculaire.

Nous pouvons donc compléter le tableau II de la façon suivante (tableau VI).

La sérine que nous avons trouvée ne semble pas avoir été signalée par les autres auteurs qui nous ont précédés, sauf Bourland [3 bis] et Kasuya et ses collaborateurs [15], mais en revanche elle a été trouvée souvent parmi les protéines du bacille. Par contre, nous n'avons pas retrouvé l'isoleucine, la cystine, la méthionine,

TABLEAU VI. — Amino-acides isolés à partir de la tuberculine.

AMINO-ACIDES de	la TUBERCULINE	
	Trouvé par les auteurs précé- dents.	
NH3	. +	•
Glycine(glycocolle)	++	++
Alanine	++	++
Valine	++	0
Thréonine	±	: ++
Leucine	+ ou ++	++
Isoleucine	+ ou ++	0
Phénylalanine	<u>+</u> ou ++	: : ±
Tyrosine	+ ou ?	: : +
Sérin <b>e</b>	+	: ++
Proline	+	: : <u>+</u>
Acide aspartique	+++	: : ++
Acide glutamique	+++	: ++
Cystine	±	: 0
Méthionine	±	: 0
Arginine	+++	: + et +
Lysine	+	: + et +
Histidine	+	: 0
Fryptophane	± ?	: +
Acide di-amino-pimélique non identifié (STACEY & LLOYD)	+++	: : : +?

l'histidine et la valine. Si l'on examine attentivement le tableau IV, on note une différence entre fraction active et moins active. Le tableau VII en rend compte.

# II. — MÉCANISME D'ENCHAINEMENT DES AMINO-ACIDES.

Nous n'avons fait aucune expérience particulière pour tenter d'apporter une contribution à cette partie de notre étude.

Mais pouvons-nous formuler des hypothèses sur ce point particulier à la lecture des travaux effectués sur ce sujet?

TABLEAU	VII.		Répartition	des	amino-acides	dans	les	quatre	fractions
tuberculiniques.									

Activité au ml. en U.I.	Acides aminés présents dans : les fractions actives et : absents dans les inactives :							
50	Absence de tyrosine, phénylalalanine, proline, arginine lysine.							
100	absence de lysine, mais présence nette de phenyl- alanine-proline							
170	présence des 13 acides aminés. *							
25	absence de tyrosine, tryp- tophane, phénylalanine, proline, arginine, lysine  * taches très faibles de phénylalanine et de proline							
	Activité au ml. en U.I.  50  100							

Il faut avouer qu'à part les travaux de Lederer et Asselineau [2] sur la constitution des phospholipides des Mycobactéries, abordant l'étude d'un tripeptide, ceux de l'auteur tchèque Keil, de Prague [16], et surtout des Japonais Kasuya, Goto [15 bis], on ne trouve que peu d'indications.

Tableau VIII. — Schéma possible d'enchaînement des amino-acides de la tuberculine dans deux fractions, d'après Kasuya, Goto et coll.

# COMPOSE A. LEUCINE - (Ac. ASPARTIQUE - Ac. GLUTAMIQUE Ac. & diamino-pimelique - Taurine - Lysine ARGININE - Ac. GLUTAMIQUE - GLYCINE - ALANINE LYSINE - ARGININE ) - & - ALANINE (Ac. GLUTAMIQUE - SERINE - GLYCOCOLLE ALANINE - Ac. & NH3 BUTYLIQUE - VALINE - CYSTINE) COMPOSÉ B. (Ac. ASPARTIQUE (SERINE - GLYCOCOLLE - METHIONINE TRYPTOBHANE - THREONINE - VALINE - PROLINE Ac. & NH3 BUTYLIQUE - Ac. GLUTAMIQUE - CYSTINE). - & - ALANINE (Ac. GLUTAMIQUE - SERINE - GLYCOCOLLE ALANINE - Ac. & AMINO-BUTYLIQUE - VALINE - CYSTINE)

9

I

:

Les derniers auteurs procèdent à une étude de la tuberculine P. P. D., d'une souche humaine de Mycobactéries. Cette préparation, après électrophorèse, présente deux pics dits A et B. Kasuya et ses collaborateurs déterminent la nature des acides aminés par des méthodes très fines (digestion enzymatique, puis oxydation). Ils les séparent par la méthode de Wooley et procèdent à une identification par chromatographie. Ils proposent un schéma de l'arrangement des molécules d'acides aminés, que nous résumons dans le tableau VIII.

Mais tous ces brillants travaux de l'école japonaise n'apportent pas encore de réponse à l'hypothèse d'une ou des substances (lipidiques ?) englobées ou non dans ces mailles protéiniques et à l'identification des ou du produit se fixant énergiquement sur le Noir Soudan, que nous avons détecté dans nos chromatographies.

### CONCLUSIONS

Dans le but de tenter de déterminer la composition chimique de la tuberculine, et en particulier de savoir dans quelle famille biologique peut se situer le principe actif de cette substance, on a pratiqué l'analyse chromatographique des différentes fractions protéiniques, isolées par électrophorèse en amidon, d'un lot de tuberculine.

L'une de ces fractions était nettement plus active au point de

vue biologique, testée sur le cobaye et sur l'homme.

Après hydrolyse de ces fractions, la chromatographie n'a pas révélé de grosses différences au point de vue amino-acides. On a trouvé surtout des acides aspartique et glutamique, de la sérine, du glycocolle, de la thréonine, de l'alanine, de la tyrosine, du tryptophane et de la leucine. On a isolé également de l'arginine, de la lysine et vraisemblablement de la phénylalanine et de la proline.

Cependant les fractions les moins actives n'ont pas révélé, dans nos conditions expérimentales, la présence des quatre derniers

amino-acides.

Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusions fermes de ces premiers résultats. Nos recherches continuent dans ce domaine.

# RÉSUMÉ

Les auteurs pratiquent dans ce premier travail l'analyse chromatographique des différentes fractions protéiniques, isolées par électrophorèse en amidon, d'un lot de tuberculine. L'une d'entre elles s'est révélée nettement plus active au point de vue valeur biologique testée sur le cobaye et sur l'homme. Après hydrolyse de ces fractions, la chromatographie n'a pas révélé de grandes différences au point de vue amino-acides. On a surtout trouvé des acides aspartique et glutamique, de la sérine, du glycocolle, de la thréonine, de l'alanine, de la tyrosine, du tryptophane et de la leucine.

On a également isolé de l'arginine, de la lysine, de la phényialanine et de la proline. Les fractions les moins actives n'ont pas révélé la présence des quatre derniers amino-acides.

Les auteurs continuent leurs recherches dans ce domaine.

### SUMMARY

A contribution to the study of Mycobacteria proteins.

Chromatographic study of the different proteinic fractions isolated by means of starch-electrophoresis of a tuberculin sample. One of these fractions possessed a higher biogical activity in man and guinea pigs.

No marked differences between the amino acids components of

these fractions could be demonstrated after hydrolysis.

Aspartic and glutamic acids, serine, glycocolle, threonine, alanine, tyrosine, tryptophan and leucine, were most often found.

Arginine, lysine, phenylalanine and proline were also isolated, but were not present in the least active fractions.

### BIBLIOGRAPHIE

[1] AKABORI (S.) et coll. Proc. Japan Acad., 1950, 26, 37.

[2] Asselineau (J.), Choucroun (N.) et Lederer (E.). Biochem. Biophys. Acta, 1950, 5, 197.

[3] Baldwin et coll. Biochem. Biophys. Acta, 1953, 10, 402.

[3 bis] Bourland et coll. Résum. comm. IIe Congrès Bioch., 1952, 384.

[4] Buu-Hoi et coll. Bull. Soc. Chim. France, 1943, 10, 137.

[5] CAMPBELL (L. K.). Am. Rev. Tub., 1925, 15, 450.

- [6] Debré (R.), Paraf (J.) et Dautrebande (C.). Ann. Méd., 1921, 9, 443 et 445.
- [7] Desbordes (J.) et Hirtz (J.). Première Rencontre Europ. Stand. Biol., C. R. Lyon, 1955.

[8] DISCHE (Z.). Microchimie, 1930, 8, 4.

[9] Gronwall (A.). Upsala Läzarefförh, 1947, 52, 227.

- [10] Heckly (R. J.) et Watson (D. W). Am. Rev. Tub., 1950, 61, 798 et 1954, 64, 602.
- [11] HIRTZ (J.) et FAYET (M. T.). Rev. Immunol., 1954, 18, 206.

[12] JOHNSON et COGHILL. J. Am. Chim. Soc., 1925, 47, 2838.

[13] Johnson et Brown. J. biol. Chem., 1922, 54, 721 et 1923, 57, 199.

[14] KALLOS et HOFFMANN. Biochem. Z., 1933, 226, 132.

[15] KASUYA (I.). J. Biochem. Jap., 1938, 27, 283 et 1955, 42, 805.

[15 bis] Kasuya (I.), Goto (J.) et coll. Jap. J. Med. Sci., 1956, 9, 93.

[16] Keil (R.). Z. Tub., 1957, 110, 8.

[17] KOCH (R.). Dtsch. med. Wschr., 1891, 7, 101.

[18] LONG (E.) et SEIBERT (F. B.). Am. Rev. Tub., 1926, 13, 393.

[19] LOWRY (O. H.) et coll. J. biol. Chem., 1951, 193, 265.

[20] MAG DONALD (H. J.) et BERMES (E. W.). Bioch. Biophys. Acta, 1955, 47, 290.

[21] Mejbaum (W.). Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 1939, 258, 117.

[22] PARAF (J.). C. R. Soc. Biol., 1925, 92, 792.

[23] Paraf (J.), Desbordes (J.) et Tremeau. C. R. Soc. Biol., 1944, 138, 175.

[24] PAULETTA (G.) et DEFRANCESCHI (A.). Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 271.

[25] POPPER (H.) et WARKANY (J.). Z. Tub., 1925, 42, 368.

[26] Sandor (G.). Contribution à l'étude des antigènes des microbes pathogènes, Doin, édit., Paris, 1935.

[27] Seibert (F. T.). Am. Rev. Tub., 1934, 30, 713.
[28] Seibert (F. T.) Am. Rev. Tub., 1957, 75, 601.

[29] SEIBERT (F. T.) et FABRIZIO (A.). Am. Rev. Tub., 1952, 66, 314.

[30] Seibert (F. T.). Faraday Soc. Discuss., 1953, 13, 231.

[31] STACEY (M.) et LLOYD (P. F.). In STACEY, Cib. Found. Symp. (Tuberg), Londres, 1955, Churchill, édit., p. 5 à 11.

[32] STACEY (M.) et KENT (P. W.) et coll. Bioch. Biophys. Acta, 1951, 7, 156.

[33] STACEY (M.). J. chem. Soc., 1947, 853.

[34] TULLER (E. F.) et coll. Annal. Chem., 1954, 26, 875.

[35] WOLMANN. Bull. Soc. Chim. biol., 1924, 6, 869.

[36] YONEMURA (I.) et LIZUKA (M.). Jap. J. Tub., 1956, 3, 6 et 22.

# ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE DE LA PROTÉOLYSE DE L'OVALBUMINE

par Marie KAMINSKI (\*)

[avec la collaboration de Olga GUTIERREZ (\*\*) et de Karin AXEN].

(Service de Chimie microbienne, Institut Pasteur, Paris)

La possibilité d'analyser la structure antigénique d'une protéine, en utilisant comme instrument expérimental la dégradation enzymatique de cette protéine, a été démontrée avec la sérum-albu-

mine humaine [1, 2, 3].

Ce fait a été retrouvé avec d'autres protéines, comme les toxines diphtérique [4] et tétanique [5] et les sérum-y-globulines humaines [6]. Dans le présent travail, nous avons appliqué cette méthode à l'étude de l'ovalbumine. Ce travail a fait l'objet d'une note préliminaire aux V° Journées Biochimiques Latines [7].

### MATÉRIEL.

- I. Ovalbumine de poule, cristallisée trois fois. Les solutions, débarrassées du sulfate d'ammonium par dialyse, sont conservées à 0° C en présence de merthiolate de Na à 1/10 000. La concentration est déterminée par dosage au micro-Kjeldahl (facteur de conversion azote-protéine : 6,33) et établissement d'une courbe d'étalonnage avec le réactif du biuret.
- II. Enzymes : Pepsine, trois fois cristallisée, fournie par Pentex Inc. Trypsine : a) une fois cristallisée, fournie par Pentex ; b) trypsine fournie par Difco Lab. ; c) trypsine une fois cristallisée fournie par Novo Terapeutisk Lab. « Trypure ».

Chymotrypsine, cristallisée, fournie par Worthington, Biochem. Corp. Papaïne, suspension de cristaux dans cystéine 0,03 M, fournie par

Worthington Biochem, Corp.

III. — INHIBITEURS: Diisopropylfluorophosphate (DFP) en solution dans l'isopropanol M.10-1.

Acide iodo-acétique M.10-1.

- IV. Immunsérum : Le sérum anti-ovalbumine était constitué par une solution de globulines provenant d'un mélange de sérums de douze
- (\*) Manuscrit reçu le 24 juillet 1959. (\*\*) Boursière du Ministère de la Santé Publique et de l'Université de Buenos-Aires (République Argentine).

lapins immunisés par voie intraveineuse pendant deux mois avec une suspension d'ovalbumine adsorbée sur  ${\rm Al}\,({\rm OH})_3$ . La préparation utilisée était concentrée en anticorps environ cinq fois par rapport au sérum initial. Cette préparation a été épuisée en anticorps anti-conalbumine et était conservée à  $0^\circ$  en présence de merthiolate de Na à  $1/10\,000$ .

### Méthodes.

1° Mesure du degré de la dégradation : comme précédemment [8, 9] par le titrage avec le réactif du biuret des produits précipités par l'acide

trichloracétique à 2 p. 100.

Les résultats sont exprimés en pourcentage des produits non précipitables par rapport à la solution témoin (% n. p.) [une solution d'ovalbumine conservée pendant le même temps et dans les mêmes conditions de température et de pH que les échantillons soumis à la digestion enzymatique].

2º Mesure des liaisons peptidiques rompues : comme précédemment [8, 9] par titrage direct avec le réactif du biuret, également exprimé en pourcentage par rapport au témoin.

3° Electrophorèse en gélose et immuno-électrophorèse: comme précédemment [1, 2, 9] suivant la technique de Grabar et Williams [10].

- 4º Précipitation spécifique quantitative : comme précédemment [1, 2] suivant la méthode de Heidelberger et Kendall [11]. Les précipitations sont faites avec 0,2 ml d'immunsérum et des quantités croissantes d'antigène, le volume ajusté à 0,6 ml avec ClNa 0,15 M. La quantité de précipité est exprimée en densité optique après réaction du biuret suivant la technique décrite par McDuffie et Kabat [12]. Les surnageants sont étudiés soit par la réaction du disque (ring-test), soit par précipitation en gélose.
- 5° Précipitation par double diffusion en gélose, suivant une modification de la technique d'Ouchterlony [13]. Les plaques de gélose ont 5 mm d'épaisseur. Les réservoirs ronds ont 5 mm de diamètre et sont situés à une distance de 5 mm l'un de l'autre ; dans chaque réservoir, on introduit deux gouttes de l'antigène. Le réservoir d'anticorps est rectangulaire, situé à une distance de 5 mm des réservoirs des antigènes, et il a 5 mm de large. On y coule un mélange de 1 volume de sérum pour 2 volumes de gélose fondue. Les plaques sont photographiées après dix-huit heures, soit par contact direct, soit par agrandissement.
- 6º Ultracentrifugation : Ultracentrifugeuse Spinco, modèle E, vitesse de rotation 58 780 t/min., cellule de 12 mm.

### Mode opératoire.

Les dégradations sont conduites sur des solutions d'ovalbumine contenant 10 mg/ml de protéine. Le pH désiré est obtenu par addition soit de NaOH ou de HCl, soit d'un tampon convenable. Dans le premier cas, les solutions d'ovalbumine contenaient du NaCl 0,15 M.

Toutes les dégradations sont faites à 37° et les préparations obtenues conservées ensuite à 0° en présence de merthiolate de Na à 1/10 000. Les solutions d'enzymes étaient préparées extemporanément.

### I. — DÉGRADATION PAR LA PEPSINE.

a) En milieu non tamponné : Les concentrations d'enzyme variaient de 0.001 à 1 mg pour 60 mg de substrat ; les différents pH étudiés étaient :  $1,65,\,2,\,3,5,\,4$  et 4,5.

b) En milieu tamponné:

pH 2,1 avec le tampon glycocolle-HCl 0,1 M ; 0,2 à 5 mg de pepsine pour 60 mg d'ovalbumine ;

pH 4, avec le tampon Mac Ilvaine (acide citrique, phosphate disodique). Mêmes proportions d'enzyme et de substrat que précédemment.

Pour tous ces essais, la durée de la digestion était de six heures, et la réaction était arrêtée par neutralisation avec NaOH.

### II. - DÉGRADATION PAR LA CHYMOTRYPSINE.

- a) En milieu non tamponné à pH 8: Les quantités d'enzyme utilisées variaient entre 1 et 20 mg pour 60 mg de substrat. Après vingt-quatre heures, la dégradation était arrêtée en ajoutant dans tous les tubes, y compris le témoin, une goutte de DFP. Le pH terminal des tubes contenant les proportions les plus élevées d'enzyme était abaissé jusqu'à 5 environ. Une expérience avait été faite à pH 5; il y avait un fort précipité après vingt-quatre heures de séjour à 37°. Ce précipité a pu être dissous presque complètement par neutralisation.
- b) En milieu tamponné par le tampon borate de pH 8,3 : La quantité d'enzyme variait de 2 à 10 mg pour 120 mg d'ovalbumine. Les prélèvements (2 ml) étaient effectués toutes les vingt-quatre heures pendant cinq jours ; pour les essais témoins, les prélèvements étaient faits seulement le premier et le cinquième jour. L'arrêt de la réaction enzymatique était obtenu par addition d'une goutte de DFP.

### III. — DÉGRADATION PAR LA TRYPSINE.

Les conditions de la dégradation (en milieu tamponné ou non) et les concentrations d'enzyme employées étaient les mêmes que dans le cas précédent. Dans l'expérience en fonction du temps en milieu tamponné, nous avons laissé l'enzyme en contact avec le substrat quatre jours au lieu de cinq.

### IV. - DÉGRADATION PAR LA PAPAÏNE.

La dégradation a été faite à pH 7 (tampon phosphate) avec des quantités d'enzyme variant de 0,2 à 10 mg pour 40 mg d'ovalbumine ; la durée était de quatre heures. L'arrèt de la réaction a été obtenu en ajoutant dans chaque tube une goutte d'acide iodoacétique.

### RÉSULTATS.

- A. Comparaison de l'action de différents enzymes sur l'ovalbumine et mise en évidence des modifications immunologiques qualitatives du substrat.
- 1º Dégradation par la chymotrypsine. Au point de vue quantitatif, nous avons constaté que l'attaque chymotrypsique de

l'ovalbumine se poursuit jusqu'à ce que 70 p. 100 du substrat environ ne précipitent plus par l'acide trichloracétique à 2 p. 100. En vingt-quatre heures, il faut 1/3 d'enzyme (en poids) et en quatre-vingt-seize heures, 1/30, pour parvenir à cette limite expérimentale.

Au point de vue qualitatif, nous avons suivi les modifications immunologiques par la précipitation spécifique en gélose (pl. I, fig. 1). Les divers échantillons étudiés appartiennent à une série d'expériences faites en milieu non tamponné à pH 8 (n° 21 à 26). La dégradation progressant, on observe trois stades successifs de la réaction des produits ainsi formés avec l'immunsérum antiovalbumine.

Au début, l'ovalbumine dégradée forme une ligne de précipitation qui rejoint la ligne formée par le témoin ; c'est la « réaction

d'identité » selon Ouchterlony.

Lorsque la dégradation est plus poussée, il y a formation de deux lignes de précipitation qui rejoignent la ligne du témoin (1). Ce fait indique une coupure de la molécule d'ovalbumine s'accompagnant de la scission du motif antigénique en deux groupements déterminants [1]. Les deux lignes ont d'abord sensiblement la même intensité, mais progressivement, celle qui se trouve le plus près du réservoir d'antigène s'en approche de plus en plus et s'affaiblit.

La dégradation se poursuivant, il ne subsiste plus qu'un constituant précipitant qui donne avec le témoin une « réaction croisée » selon Ouchterlony.

Nous n'avons pas pu, en comparant les résultats de huit séries d'expériences (en milieu tamponné ou non), établir une correspondance précise entre les résultats quantitatifs et qualitatifs. On peut dire cependant que le premier stade (avant la scission) correspond à des échantillons dégradés contenant moins de 50 p. 100 de produits non précipitables par l'acide trichloracétique à 2 p. 100 Le troisième stade (après destruction de l'un des groupements déterminants) correspond à des échantillons contenant environ

<sup>(1)</sup> Remarque au sujet des résultats de la précipitation spécifique en gélose : l'observation du dédoublement de la ligne unique formée par les échantillons peu dégradés en deux lignes distinctes, correspondant à la scission du motif antigénique, est faite entre dix-huit et vingt-quatre heures après la mise en place des réactifs dans la plaque de gélose. Les images photographiques ainsi obtenues ne peuvent pas être confondues avec les « dédoublements » non spécifiques [14] qui s'observent souvent dans ces conditions, mais seulement après quelques jours (minimum quarante-huit heures) d'évolution de la précipitation, et qui aboutissent à la formation en fonction du temps d'un nombre progressivement croissant de lignes de précipitation pouvant atteindre une dizaine.

70 p. 100 n. p., c'est-à-dire à la saturation du substrat en enzyme dans nos conditions expérimentales.

La figure 1 représente schématiquement l'ensemble des résultats quantitatifs et qualitatifs d'une série de dégradations, faites en milieu tamponné en fonction du temps. Les modifications immunologiques successives, d'après l'analyse par précipitation spécifique en gélose, sont figurées par le trait plein pour le premier stade de dégradation, par le trait interrompu pour les échantillons formant deux lignes de précipité et par le trait pointillé pour les échantillons formant une seule ligne.

Il faut souligner que, lors de la dégradation chymotrypsique et

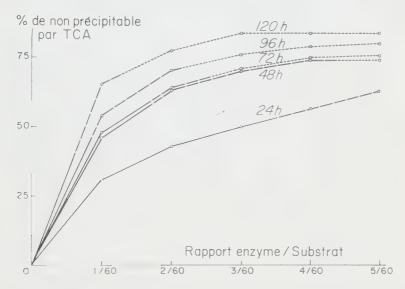


Fig. 1. — Dégradation de l'ovalbumine par la chymotrypsine en % des produits non précipitables par l'acide trichloracétique à 2 %. Les modifications immunologiques, d'après l'analyse par précipitation spécifique en gélose, sont figurées par le trait plein : avant la seission du motif antigénique ; trait interrompu : présence de deux produits précipitants ; trait pointillé : après disparition de l'un des deux produits précipitants.

dans nos conditions expérimentales, le pH n'influe pas sur la scission du motif antigénique de l'ovalbumine entre pH 5 et 8. Des expériences faites en milieu tamponné ou non et même conduites entièrement à pH 5 nous ont donné des résultats comparables du point de vue qualitatif.

L'étude électrophorétique (pl. I, fig. 2) des produits dégradés n'a pas montré de modifications qualitatives; l'hétérogénéité électrophorétique de l'ovalbumine (résultant de la présence de trois constituants A, B et C, de mobilité différente) persiste, du moins au début, car ensuite l'intensité de la tache colorée diminue très fortement et l'observation est gênée par la tache formée par l'enzyme. Au cours de la dégradation, il ne se forme aucun fragment de mobilité différente de celle de l'ovalbumine que nos méthodes de coloration et de fixation puissent déceler.

L'analyse immuno-électrophorétique (pl. I, fig. 2) montre les trois mêmes stades que la précipitation spécifique en gélose. Les deux constituants précipitants formés par la scission du motif antigénique ont la même mobilité électrophorétique; tout au plus celui qui précipite le plus près du réservoir d'antigène semble moins dispersé ou moins hétérogène du point de vue électropho-

rétique que l'autre et également moins que le témoin.

2º Dégradation par la trypsine. — Une remarque préliminaire concerne la préparation enzymatique utilisée. Avec la trypsine Pentex, nous avons observé [7] la scission du motif antigénique de l'ovalbumine aboutissant à la formation en gélose de deux lignes de précipité spécifique. Il fallait ajouter jusqu'à la moitié du poids de substrat de cette préparation pour arriver à un stade de dégradation où 30 p. 100 du produit ne précipitent plus par l'acide trichloracétique à 2 p. 100. Lorsque nous avons utilisé de la Trypure Novo, nous n'avons pu observer aucune modification immunologique et pratiquement pas de dégradation mesurable. La trypsine Difco s'est révélée la plus active et les résultats décrits concernent cette dernière préparation.

Les résultats de la dégradation de l'ovalbumine par la trypsine sont en gros analogues à ceux obtenus avec la chymotrypsine, c'est-à-dire que l'on observe la scission du motif antigénique et

les trois mêmes stades de modifications immunologiques.

En ce qui concerne la précipitation spécifique en gélose, l'hydrolysat trypsique forme deux lignes de précipitation dont l'observation est moins aisée que pour la dégradation chymotrypsique, car les deux lignes sont très rapprochées l'une de l'autre (pl. I, fig. 1).

Au point de vue quantitatif, l'action de la trypsine est plus marquée et la dégradation s'arrête pour le stade où il y a 90 à 94 p. 100 de n. p. et ceci pour les proportions d'enzyme et de substrat et le temps de contact suivants : 1/3 en vingt-quatre heures et 1/30 en soixante-douze heures.

Parallèlement, les modifications immunologiques se manifestent plus rapidement que pour la dégradation chymotrypsique; ainsi, on observe la scission en deux constituants quand il y a moins de 25 p. 100 de n. p. Le stade où l'un de deux constituants (il s'agit toujours de celui qui, en gélose, précipite le plus près du réservoir d'antigène) n'est plus décelé s'observe, de même que

dans le cas de la chymotrypsine, à partir des échantillons dégradés contenant environ 70 p. 100 de non précipitable par l'acide trichloracétique.

La différence entre la dégradation trypsique et chymotrypsique concerne le mode d'action de ces deux enzymes. On peut le mettre en évidence en mesurant le pouvoir biurétogène du substrat en fonction de la dégradation. Nous avons constaté que, dans le cas de la chymotrypsine, il n'y a pratiquement pas de différence

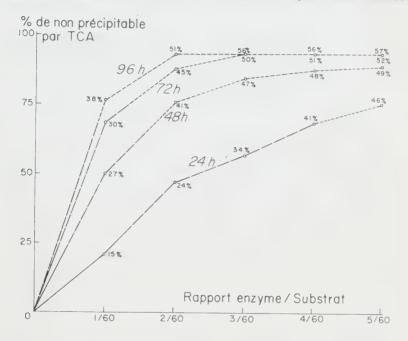


Fig. 2. — Dégradation de l'ovalbumine par la trypsine en % de produits non précipitables par l'acide trichloracétique à 2 %. Les modifications immunologiques, d'après l'analyse par précipitation en gélose, sont figurées par le trait plein : avant la scission du motif antigénique; trait interrompu : présence de deux produits précipitants; trait pointillé : après disparition de l'un de deux produits précipitants. Le % des liaisons peptidiques rompues (pouvoir biurétogène) est indiqué pour chaque échantillon.

à ce point de vue entre les échantillons précipitant entièrement ou très peu par l'acide trichloracétique. Dans le cas de la trypsine, le pouvoir biurétogène change très nettement, puisqu'il baisse de plus de moitié lorsque la dégradation s'arrête. Les différentes valeurs obtenues pour les échantillons dégradés en milieu tamponné en fonction du temps et de la quantité d'enzyme sont rapportées dans la figure 2.

A plusieurs reprises, nous avons comparé par la précipitation en gélose, les produits de dégradation chymotrypsique et trypsique. En ce qui concerne les échantillons formant deux lignes, nous avons observé la jonction parfaite pour chacune d'elles.

En ce qui concerne les produits de dégradation formant une seule ligne de précipitation, on observe également l'identité entre les échantillons résultant de l'attaque trypsique ou chymotrypsique, chacun d'eux donnant une nette image de « réaction croisée » avec l'ovalbumine non dégradée (fig. 1 et pl. I, fig. 3).

Pour apprécier l'ordre de grandeur des fragments de la molécule résultant de la dégradation trypsique qui conservent encore le pouvoir de précipiter avec les anticorps anti-ovalbumine alors que 94 p. 100 du substrat initial ne précipite plus par l'acide trichloracétique 2 p. 100, nous les avons dialysés. Après vingtquatre heures de dialyse contre un volume double de tampon, on constate la perte de la moitié du pouvoir biurétogène, mais les produits dialysables ne possèdent pas de propriétés immunologiques précipitantes ni inhibitrices.

Soumis à l'ultracentrifugation (2), l'échantillon dialysé (de concentration en protéine 0,8 p. 100) n'a pas sédimenté après soixante-quatre minutes à 59 780 t/mn.

L'étude électrophorétique et immuno-électrophorétique des produits de la dégradation trypsique a donné des résultats analogues à ceux obtenus après dégradation chymotrypsique avec la différence d'intensité plus faible des taches et des lignes due à la dégradation quantitativement plus importante.

- 3º Dégradation par la papaïne. Les échantillons dégradés par la papaïne dont 20 et 30 p. 100 ne sont pas précipitables par l'acide trichloracétique à 2 p. 100 forment, par précipitation spécifique en gélose, deux lignes rejoignant respectivement les deux lignes formées par l'ovalbumine dégradée par la chymotrypsine ou la trypsine. La proportion d'enzyme utilisée pour obfenir ces produits était de 1/8 et 1/4 pendant quatre heures. Nous n'avons pas poursuivi cette dégradation plus loin.
- 4º Dégradation par la pepsine. Aux environs de pH 2, la pepsine attaque l'ovalbumine sans en modifier le comportement qualitatif en tant qu'antigène. En effet, même les produits dégradés jusqu'à 96 p. 100 n. p. précipitent encore avec l'immunsérum en donnant une réaction d'identité avec le témoin. A pH 3,5 et 4,5, nous n'avons pas observé de dégradation mesurable, ni aucune modification immunologique qualitative.
- (2) Nous remercions le  $D^r$  Francq, du Service des Virus de l'Institut Pasteur, qui a bien voulu effectuer les ultracentrifugations.

B. — ETUDE PAR PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE QUANTITATIVE DES PRODUITS DE LA DÉGRADATION CHYMOTRYPSIQUE ET TRYPSIQUE.

1º Dégradation chymotrypsique. — La figure 3 représente les courbes de précipitation spécifique quantitative des échanfillons dégradés par la chymotrypsine en milieu non tamponné à pH 8 (voir pl. I, fig. 1 et 2); l'analyse des surnageants de ces courbes (par « ring-test ») est donnée dans le tableau I.

Les courbes de l'ovalbumine non traitée (OVN) et d'ovalbumine

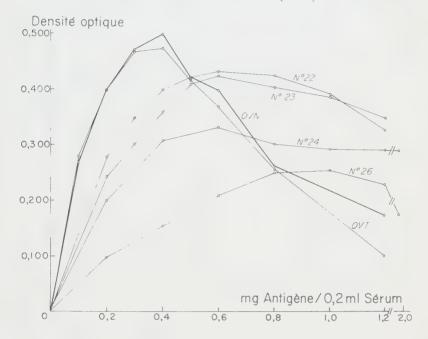


Fig. 3. — Précipitation spécifique quantitative de quelques échantillons d'ovalbumine dégradée par la chymotrypsine (voir fig. 1 et 3).

témoin (OVT) [vingt-quatre heures à 37° à pH 8] sont extrêmement voisines; toutes les deux présentent une zone d'équivalence très nette pour 0,3 mg d'antigène (1,5 mg/ml de sérum).

Les deux échantillons dégradés n°s 22 et 23 qui ne forment

Les deux échantillons dégradés n°s 22 et 23 qui ne forment qu'une ligne de précipitation en gélose (pl. I, fig. 1) et contiennent respectivement 34 et 40 p. 100 n. p. donnent des courbes dont le maximum de précipitation est un peu abaissé par rapport au témoin et correspond à une quantité d'antigène ajouté plus importante. Nous n'avons pas constaté pour ces deux échantillons de zone d'équivalence nette ou du moins elle est très

étroite et certains surnageants épuisés en antigène homologue précipitent encore avec l'ovalbumine non dégradée.

Tableau I. — Dégradation par la chymotrypsine. Analyse des surnageants des courbes de la figure 3.

ée

Antigène m	g antigène/ml antisérum	Réaction du antisérum	ovalbumine	ng-test) avo ovalbumine non dégrado
Ovalbumine	0,5	_		++
	1	-		+
	1,5	-		-
	2	+		-
	2,5	++		-
	3	++		~
Ovalbumine				
témoin	0,5	-	++	++
	1	-	+	+
	1,5		-	-
	2	+	_	-
	2,5	++	-	-
	3	++	-	-
Echantillon				
dégradé n°22	1	~	++	++
	1,5	7	+	++
	2	+	-	+
	2,5	+	-	-
	4	++	_	-
	*	++	-	-
Echantillon				
dégradé n°23	1	-	++	++
	1,5	-	+	++
	2		+	++
	2,5	+	-	+
	3	++	-	_
	4	++	-	-
Echantillon				
dégradé n°24	1	_	++	++
	2	+	+	++
	3	++	-	++
	4	++	-	++
	5	++		+
	6	++	-	-
	8	++	-	-
Echantillon				
dégradé n°26	1	-	++	++
	2		+	++
	3	-	~	++
	4 5		940	++
		+		++
	6	++	_	++
	O	++	-	++

L'échantillon n° 24 formant en gélose deux lignes de précipitation (pl. I, fig. 1) donne une courbe très différente de celle du témoin : elle est aplatie, le maximum est très abaissé et correspond à une quantité d'antigène légèrement plus élevée par rapport au témoin. Il n'y a plus de zone d'équivalence qui est remplacée par une zone où les surnageants précipitent à la fois avec l'antigène et l'antisérum. Les surnageants épuisés par l'antigène homologue precipitent encore fortement avec l'ovalbumine non dégradée.

Enfin la courbe de l'échantillon n° 26, celui qui ne forme qu'une ligne en gélose (pl. I, fig. 1) est encore plus modifiée. Le maximum est abaissé jusqu'à la moitié et correspond à une quantité d'antigène plus que doublée par rapport à celle du témoin. La zone d'équivalence existe de nouveau, très large, et tous les

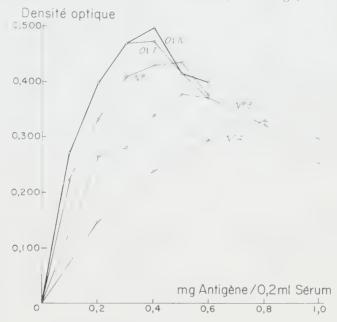


Fig. 4. — Précipitation spécifique quantitative de quelques échantillons d'ovalbumine dégradée par la trypsine (voir fig. 1).

surnageants précipitent fortement avec l'ovalbumine non dégradée. La figure 4, planche I, représente une étude par précipitation spécifique en gélose de quelques surnageants de ces courbes, comparés aux échantillons dégradés eux-mêmes. Elle montre que lorsqu'on ajoute des quantités croissantes d'échantillon n° 24 à l'immunsérum, on épuise d'abord celui des deux constituants qui précipite en gélose le plus près du réservoir d'antigène. Les surnageants de la fin de la courbe de l'échantillon n° 24 (8 et 10 mg par millilitre de sérum) contiennent ainsi un antigène précipitant identique à celui de l'échantillon n° 26. Cependant leur composition n'est pas identique à celle des surnageants analogues de la courbe de l'échantillon n° 26 car, s'ils contiennent un anti-

gène précipitant commun, les premiers ne contiennent plus d'anticorps libres réagissant avec l'ovalbumine, alors que les seconds en contiennent, ainsi qu'en témoigne la forte ligne de précipitation bien visible sur la figure (se reporter également au tableau I).

2º Dégradation trypsique. — La figure 4 et le tableau II représentent les courbes de précipitation et l'analyse des surnageants pour trois échantillons dégradés par la trypsine. L'échantillon n° 1, qui correspond à un stade de dégradation avant la scission du motif antigénique (pl. I, fig. 1) et contient 19 p. 100 de produits non précipitables par l'acide trichloracétique et 12 p. 100 de liaisons peptidiques rompues (mesurées par l'abaissement du pouvoir biurétogène), donne une courbe de précipitation dont le maximum est légèrement inférieur à celui du témoin pour une quantité d'antigène très légèrement supérieure. Cette courbe a une zone d'équivalence étroite, pour pratiquement la même quantité d'antigène que le témoin. Un surnageant épuisé par l'antigène homologue précipite encore avec l'ovalbumine non dégradée.

Tableau II. — Dégradation par la trypsine. Analyse des surnageants des courbes de la figure 4.

Antigène	mg antigène/ml antisérum		ovalbumine	
Echantillon				
dégradé n°l	0,5	-	++	++
	1	_	+	+
	1,5	<u>+</u>		+
	2	++	-	-
	2,5	++	-	40
Echantillon				
dégradé n°3	1	-	++	++
	1,5	-	÷	++
	2	~	ten	++
	2,5	+	-	+
	3	++	_	+
	4	++	_	+
	5	++	**	+
Echantillon				
dégradé nº4	1	-	++	++
	2	***	+	++
	3			+-
	4	+	_	++
	5	++	_	+
		~ ~ ~		Т

L'échantillon n° 3 formant deux lignes en gélose (pl. I, fig. 1) et contenant 60 p. 100 de produits non précipitables par l'acide trichloracétique à 2 p. 100 et 32 p. 100 de liaisons peptidiques rompues, donne une courbe dont le maximum est bien inférieur à celui du témoin, et ceci pour une quantité d'antigène ajouté égale à celle de l'échantillon n° 1. Cette courbe présente une légère irrégularité dans sa première partie, mais dans son ensemble n'est pas aplatie et possède une zone d'équivalence pour une quantité d'antigène supérieure à celle du témoin. Tous les surnageants étudiés. épuisés avec l'antigène dégradé, réagissent encore avec l'ovalbumine.

La courbe de l'échantillon n° 4 donnant une seule ligne en gélose (pl. I, fig. 1) [79 p. 100 n. p. et 43 p. 100 de liaisons peptidiques rompues] est sensiblement plus abaissée encore que la précédente et le maximum correspond à une quantité d'antigène ajouté double de celle du témoin. La zone d'équivalence est nette et s'observe pour une quantité d'antigène également double de celle du témoin. De nouveau, tous les surnageants épuisés par l'échantillon n° 4 précipitent avec l'ovalbumine non dégradée.

### DISCUSSION.

Nous avons vu qu'au cours de sa dégradation par la chymotrypsine, la trypsine et la papaïne, l'ovalbumine subit des modifications immunologiques permettant d'analyser sa structure antigénique. Ce fait peut être observé aisément lors de la précipitation spécifique en gélose, car les échantillons convenablement dégradés forment deux lignes de précipitation rejoignant celle formée par le témoin. Il s'agit donc bien, au cours de la dégradation, de la formation, à partir d'un système précipitant initial unique, de deux systèmes précipitants différents. Soulignons à ce propos qu'ayant observé : 1º la formation avec chacun des trois enzymes de deux fragments précipitants distérents, et 2º l'identité par précipitation spécifique en gélose de chacun de ces fragments avec des fragments analogues obtenus après dégradation par d'autres enzymes, il est assez peu vraisemblable que le motif antigénique de l'ovalbumine comporte plus de deux groupements précipitants différents. Cependant il est possible que chacun de ces groupements se révèle complexe à son tour, ainsi qu'il a été observé pour la sérumalbumine humaine [2].

Cette formation de deux lignes de précipitation en gélose ne peut cependant pas, à elle seule, nous faire savoir s'il s'agit de systèmes précipitants indépendants l'un de l'autre, comme c'était le cas pour la sérumalbumine dégradée par l'extrait de rate de lapin [1] ou la pepsine et la chymotrypsine [2], ou bien, comme pour la dégradation trypsique de la sérumalbumine, d'une des-

truction partielle dont les produits ont une spécificité com-

mune [2, 15].

Les produits de dégradation de l'ovalbumine ayant une même mobilité électrophorétique que le substrat initial, contrairement à ce qui se passait pour la sérumalbumine [1, 2, 9], l'immuno-électrophorèse ne nous permet pas non plus de trancher cette question.

Il est donc nécessaire d'étudier ces produits par la précipitation spécifique quantitative et, d'après l'allure des courbes ainsi établies et les résultats des épreuves sur les surnageants, déduire la

nature des modifications subies par le substrat.

En ce qui concerne la dégradation chymotrypsique, il y a une analogie étroite avec ce qui se passe pour la sérumalbumine dégradée par l'extrait de rate, la pepsine et la chymotrypsine:

- a) Lorsque la protéolyse aboutit à la scission du motif antigénique, la courbe de précipitation spécifique est abaissée et il n'y a pas de zone d'équivalence.
- b) On épuise les deux sortes d'anticorps successivevment, ce qui montre bien qu'on est en présence de deux systèmes indépendants.
- c) On peut épuiser tous les anticorps anti-ovalbumine avec l'échantillon ainsi dégradé.
- d) Quand la dégradation est poussée jusqu'au stade où il ne subsiste qu'un seul constituant précipitant, le maximum de précipitation est nettement inférieur à celui du témoin et on observe une zone d'équivalence; il s'agit donc à nouveau d'un système précipitant simple.

### PLANCHE I

- Fig. 1. Précipitation spécifique par double diffusion en gélose. Mise en évidence de la scission du motif antigénique après dégradation de l'ovalbumine par la chymotrypsine et la trypsine. Les échantillons analysés sont les mêmes que sur les fig. 1, 2, 3 et 4; ils sont désignés par un numéro et le % des produits non précipitables par l'acide trichloracétique à 2 %. T: témoin de l'expérience. OV: ovalbumine. Les n°s 22 à 26: dégradation chymotrypsique. Les n°s 1 à 6: dégradation trypsique.
- Fig. 2. Electrophorèse en gélose et immuno-électrophorèse des échantillons dégradés par la chymotrypsine (n° 21, 22, 23, 24 et 26) [voir fig. 1].
- Fig. 3. Précipitation spécifique par double diffusion en gélose. Comparaison des produits de dégradation de l'ovalbumine par la chymotrypsine (OV + Ch) et la trysine (OV + T) par rapport à l'ovalbumine non dégradée.
- Fig. 4. Précipitation spécifique par double diffusion en gélose. Etude des quelques surnageants de la précipitation spécifique en milieu liquide (voir fig. 3 et tableau I).

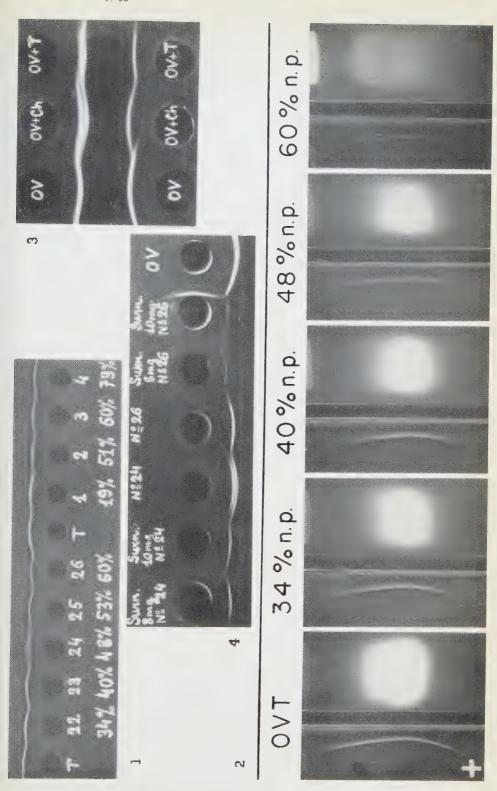
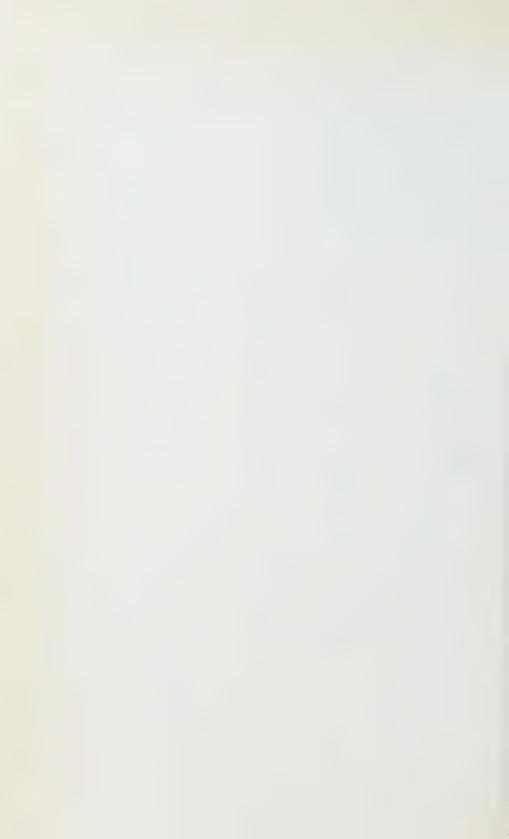


Planche 1.



e) Dans ce dernier cas on ne peut épuiser tous les anticorps anti-ovalbumine avec l'échantillon dégradé.

Au sujet de la précipitation spécifique quantitative, remarquons encore que la ressemblance étroite des courbes de l'ovalbumine non traitée et du témoin montre que le séjour à 37° à pH 8 ne dénature apparemment pas l'ovalbumine et qu'il n'y a pas de formation d'agrégats, comme cela a été observé pour la sérumalbumine [16]. L'ultracentrifugation a d'ailleurs fourni pour le témoin une valeur de S très voisine de celle de l'ovalbumine.

L'ensemble de ces résultats permet de montrer que l'une des deux lignes observées en gélose ne peut pas être due à l'ovalbumine non modifiée. En effet, la ligne formée le plus loin du réservoir d'anticorps pourrait être due à des fragments portant une partie du motif antigénique initial et la ligne formée en arrière à l'ovalbumine, on se trouverait dans le cas d'un système précipitant donnant une réaction croisée: l'antigène hétérologue, lorsque son coefficient de diffusion est plus faible, ou s'il est présent en quantités importantes, précipite en avant en laissant une partie des anticorps qui précipiteront avec l'antigène homologue. Le fait que la ligne précipitant en avant subsiste seule lorsque la dégradation se poursuit s'accorde avec cette interprétation, car on peut admettre que l'ovalbumine disparaît progressivement au profit des produits dégradés. Cependant, les résultats de la précipitation quantitative rendent cette hypothèse invraisemblable, car c'est le constituant formant la ligne la plus rapprochée de la source d'antigène qui est épuisé le premier; or, si c'était l'ovalbumine, tous les anticorps seraient précipités à ce

En ce qui concerne la dégradation trypsique, les faits sont différents. La courbe de précipitation de l'échantillon formant deux lignes de précipité en gélose est bien abaissée par rapport au témoin, mais elle présente une zone d'équivalence et son allure ressemble à celle d'un système simple. De plus, on ne peut pas épuiser tous les anticorps anti-ovalhumine avec cet échantillon dégradé. Il s'agit donc, dans ce cas, d'une dégradation provoquant à la fois la scission du motif antigénique et une destruction partielle d'un ou de deux groupements déterminants. Lorsque la dégradation se poursuit, l'action protéolytique paraît qualitativement analogue à celle de la chymotrypsine, puisqu'on aboutit à la destruction totale de l'un des deux groupements déterminants alors que l'autre persiste jusqu'à un stade de dégradation très avancé. La courbe de précipitation présente pour ce stade toutes les caractéristiques d'un système simple et l'étude des surnageants montre qu'il s'agit d'un système formant avec l'ovalbumine et le sérum anti-ovalbumine une réaction croisée.

Ainsi, dans le cas de dégradation par la trypsine comme pour la chymotrypsine, aucun des deux constituants précipitants ne

peut être l'ovalbumine non modifiée.

L'allure particulière de la courbe de précipitation de l'échantillon trypsique contenant deux constituants précipitants, différente des courbes que l'on obtient dans les cas analogues (sérumalbumine dégradée par l'extrait de rate de lapin, la pepsine et la chymotrypsine, ovalbumine dégradée par la chymotrypsine) pourrait s'expliquer par la superposition des deux courbes dues aux deux systèmes précipitants. Il se pourrait, en effet, que les deux fragments porteurs des groupements déterminants séparés aient des points d'équivalence très voisins (la courbe de l'échantillon donnant une seule ligne en gélose présente un point d'équivalence déplacé vers des quantités d'antigène plus grandes, mais ceci peut ètre dû à la dégradation assez poussée: 79 p. 100 n. p. et l'appauvrissement consécutif en antigène précipitant) de même qu'en gélose ils forment deux lignes plus rapprochées l'une de l'autre que dans le cas de dégradation chymotrypsique. Pour un mélange constitué de deux systèmes seulement on ne peut exclure la possibilité de superposition de deux courbes de précipitation en milieu liquide ou de deux lignes de précipitation en milieu gélifié.

S'agit-il de deux constituants indépendants? Le fait que nous observions généralement l'identité de chacune des deux lignes en comparant par précipitation en gélose les échantillons dégradés par la chymotrypsine et la trypsine plaide, par analogie, en faveur de l'idée que les deux fragments précipitants obtenus lors de la dégradation trypsique sont indépendants. Cependant nos résultats

n'apportent pas de preuves formelles.

Il est intéressant de comparer les résultats que nous venons de discuter à l'action des mêmes enzymes sur la sérumalbumine humaine [1, 2, 9]. Dans ce cas, la scission du motif antigénique était obtenue par un extrait de rate de lapin, la pepsine et la chymotrypsine, alors que la trypsine dégradait le substrat sans séparer ses groupements déterminants. Ajoutons, pour compléter cette comparaison, que l'extrait de rate de lapin ne dégrade pas l'ovalbumine et que, d'autre part, la papaïne n'attaque pas la sérumalbumine dans les mêmes conditions opératoires que pour l'ovalbumine.

Ainsi se trouve confirmé une fois de plus que la spécificité des cazymes protéolytiques telle qu'elle est établie d'après leur action sur les substrats synthétiques ne permet pas de préjuger de leur comportement vis-à-vis d'une molécule de protéine. Pour l'analyse du motif antigénique d'une protéine donnée, le choix de l'enzyme protéolytique capable de cliver ce motif en ses groupements constitutifs ne peut actuellement être fait que de façon empirique.

On peut cependant dire que, pour chacun des enzymes, l'attaque

semble se faire d'une façon qui lui est propre et qu'ils dégradent un substrat protéinique d'une façon différente à la fois quantitativement et qualitativement. Ainsi, dans la dégradation de l'ovalbumine par la chymotrypsine et la trypsine, lorsque la scission du motif antigénique est atteinte, le taux des liaisons peptidiques (mesuré par le pouvoir biurétogène par rapport à celui du substrat) est très peu modifié dans le premier cas et diminué de moitié dans le deuxième cas. Les liaisons rompues n'interviennent

donc pas dans le motif antigénique de l'ovalbumine.

Par ailleurs, le fait que le motif antigénique soit scindé seulement lorsqu'une partie considérable de la molécule a déjà été dégradée, montre qu'apparemment cette structure particulière n'est pas très facilement atteinte, contrairement à ce qui se passait pour la sérumalbumine dégradée par la pepsine [2, 9] et il est probable que l'enzyme doit d'abord « ouvrir » la molécule. Les deux fragments précipitants obtenus à ce stade n'ont vraisemblablement pas la même masse moléculaire, comme l'indique leur comportement différent lors de la diffusion en gélose. Celui qui correspond à une diffusion plus faible est également celui qui est dégradé plus rapidement. Quant au second, il garde son pouvoir précipitant même lorsque 70 p. 100 ou plus de substrat initial sont dégradés. Le groupement déterminant porté par ce fragment est donc encore mieux « protégé » que le premier.

D'une façon générale, l'action de ces divers enzymes sur l'ovalbumine doit être plus intense que dans le cas de la sérumalbumine pour obtenir des résultats analogues, ce qui peut fournir un renseignement sur la structure moins accessible au clivage de l'ensemble du motif antigénique et sa situation sur la molécule de

l'ovalbumine.

Nous n'avons pas remarqué qu'au point de vue des propriétés immunologiques l'action de la chymotrypsine ou de la trypsine sur l'ovalbumine change en suivant le pH entre pH 5 et 8. Ceci constitue une différence de plus dans la dégradation par ces enzymes de la sérumalbumine [9] et de l'ovalbumine. Soulignons que nous avons obtenu une dégradation notable en soumettant l'ovalbumine à l'attaque trypsique, alors que plusieurs auteurs [17, 18] ne l'ont pas constatée avec l'ovalbumine cristallisée mais seulement après dénaturation. Il ne peut s'agir d'impureté chymotrypsique, car les résultats sont qualitativement différents dans chaque cas et quantitativement la trypsine agit plus intensément que la chymotrypsine.

Les expériences de dialyse et d'ultracentrifugation nous permettent de situer très approximativement le poids moléculaire du fragment obtenu après dégradation trypsique prolongée entre 10 et 20 000. Le fait que les produits dialysables formés au cours de cette dégradation ne présentent pas de propriétés immunologiques permet d'espérer, d'obtenir par une dégradation encore plus poussée, un fragment plus petit, portant un seul groupement

déterminant de l'ovalbumine.

En ce qui concerne le mode d'action des enzymes étudiés, nous n'avons pas observé de formation de produits intermédiaires de la réaction : le substrat est dégradé progresisvement et les fragments enlevés sont de petit poids moléculaire ; en effet, ils dialysent et ne précipitent pas lors de la révélation de l'électrophorèse en gélose par l'acide acétique à 2 p. 100.

De plus, le substrat initial disparaît assez vite au cours de la dégradation; en tout cas il n'y en a plus dès que la scission du motif antigénique est accomplie. Il semble donc qu'on puisse rapprocher ce type de dégradation de la réaction en « fermeture

éclair de Lindeström-Lang ».

### Conclusions.

La dégradation par la chymotrypsine, la trypsine et la papaïne provoque la scission du motif antigénique de l'ovalbumine et formation de deux constituants différents, précipitant avec des anticorps correspondants présents dans le sérum de lapin antiovalbumine. Au fur et à mesure de la protéolyse par la chymotrypsine ou la trypsine, l'un des deux déterminants antigéniques est détruit et le deuxième persiste jusqu'à un stade de dégradation avancé.

Les deux constituants précipitants obtenus sont immunologiquement identiques quel que soit l'enzyme utilisé pour la dégradation.

La pepsine dégrade l'ovalbumine sans provoquer de modifications immunologiques qualitatives.

### SUMMARY

Immunochemical studies on proteolysis of ovalbumin.

The antigenic structure of ovalbumin has been studied by means of enzymic digestion. Chymotrypsin, trypsin and papain split ovalbumin into two different precipitating components which react with different antibodies present in the rabbit anti-ovalbumin serum.

During digestion by chymotrypsin and trypsin, one of the constituents is destroyed. The second component persists until the reaction terminates.

These two different precipitating constituents formed by digestion are immunologically the same independently of the enzyme employed.

Pepsin digests ovalbumin without causing qualitative immuno-

logical modifications.

\* \*

Nous remercions M. Grabar pour ses fructueuses critiques et pour l'accueil qu'il a réservé à l'une de nous dans son Service (O. G.) durant son stage à l'Institut Pasteur.

### BIBLIOGRAPHIE

[1] LAPRESLE (C.). Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, 654.

[2] LAPRESLE (C.), KAMINSKI (M.), TANNER (C. E.). J. Immunol, 1959, 82, 94.

[3] LAPRESLE (C.). Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 626.

[4] Relyveld (E. H.). Thèse de Doctorat ès-sciences, Paris 1958.

[5] Turpin (A.). Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 718.

- [6] Scheidegger (J. J.), Buzzi (C.). Rev. Fr. Et. clin. biol., 1957, 2, 895; Burtin (P.) [résultats non publiés].
- [7] Kaminski (M.) et Gutierrez (O.). Résumés des Communications Ves Journées Biochimiques Latines, Barcelone, mai 1959.

[8] LAPRESLE (C.). Bull. Soc. Chim. biol., 1955, 37, 969.

- [9] Kaminski (M.), Tanner (C. E.). Biochim. Biophys. Acta, 1959, 33, 10.
- [10] GRABAR (P.), WILLIAMS (C. A. Jr). Biochim. Biophys. Acta, 1955, 47, 67; GRABAR (P.) in Methods of Biochemical Analysis, 1958, vol. VII.
- [11] Heidelberger (M.), Kendall (F. E.). J. exp. Med., 1935, 62, 47.
- [12] McDuffie (F. C.), Kabat (E. A.). J. Immunol., 1956, 77, 193.

[13] KAMINSKI (M.). Biochim. Biophys. Acta, 1954, 13, 216.

- [14] Kaminski (M.). Colloque Diff., Montpellier, 1955, Publi. Sci. Min. Air, 1956, 59, 69.
- [15] LAPRESLE (C.), WEBB (T.), KAMINSKI (M.), CHAMPAGNE (M.). Bull. Soc. Chim. biol., 1959, 41, 695.
- [16] LAPRESLE (C.) et SLIZEWICZ (P.). Bull. Soc. Chim. biol., 1958, 40, 1085.
- [47] HAUROWITZ (F.), TUNCA (M.), SCHWERIN (P.) et GOKSU (V.). J. biol. Chem., 1945, 457, 621.
- [18] RAO SHANTA (S.), RAO (S. S.). Indian J. med. Res., 1955, 43, 617.

# ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE DES HÉMOLYSATS DES GLOBULES ROUGES HUMAINS

I. - PRINCIPAUX CONSTITUANTS ANTIGÉNIQUES

par Noël ROSE, François PEETOOM, Shaun RUDDY, Antoine MICHELI et Pierre GRABAR (\*).

(Service de Chimie microbienne, Institut Pasteur, Paris)

Les méthodes immunochimiques se sont révélées très précieuses pour l'étude de la composition de différents liquides et tissus humains; le sérum ou le plasma ont été les plus étudiés. L'analyse immuno-électrophorétique s'est montrée particulièrement utile; elle a permis de déceler déjà 24 antigènes différents dans le sérum humain normal, et des études sont poursuivies dans ce laboratoire depuis plusieurs années en vue de découvrir leur origine et de mettre en évidence des modifications de leur composition antigénique dans divers états pathologiques (voir par exemple les revues d'ensemble, 9, 10, 11, 12, 19, 28).

L'application des mêmes méthodes à l'étude des constituants spécifiques des tissus solides est rendue difficile par la présence du sang et du liquide interstitiel; il est d'autre part nécessaire de prendre des précautions spéciales pour extraire les constituants intracellulaires sans provoquer de modifications de leurs propriétés. Dans le cas des globules rouges, ces difficultés sont moindres du fait qu'on peut facilement les laver jusqu'à complète disparition du sérum et les lyser par simple changement de la pression osmotique. De plus, les globules rouges présentent une relative uniformité dans leur population et ne sont souillés par aucun tissu conjonctif ou graisseux.

Il est surprenant, toutefois, de ne trouver que peu d'informations sur les constituants internes des érythrocytes et leur comportement immunologique [3, 4, 7, 8], bien que leurs antigènes de surface, et spécialement les iso-antigènes, aient été étudiés depuis bon nombre d'années.

Pour combler cette lacune, nous avons entrepris une étude des principaux constituants antigéniques des érythrocytes humains, susceptibles d'être décelés à l'aide d'immunsérums de lapin antihémolysats humains. Nous espérons pouvoir ainsi les définir ou les caractériser et tenter ensuite de déterminer leur rôle ou fonc-

<sup>(\*)</sup> Manuscrit reçu le 17 juillet 1959.

tion dans la cellule. D'autre part, la connaissance des constituants normaux permettrait l'étude des modifications pathologiques possibles.

Ce premier mémoire décrit la réaction des hémolysats avec les sérums de lapin anti-hémolysats.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1º Préparation des hémolysats complets de globules rouges (Hem C/c). — La méthode décrite ci-dessous est notre méthode-étalon de préparation des hémolysats. Quelques autres méthodes de préparation ont été employées pour des comparaisons ; elles seront décrites dans la partie expérimentale de cet article.

Le sang humain a été prélevé sur l'héparine et les globules lavés six fois dans une solution saline physiologique. On a utilisé pour chaque lavage environ 15 ml de solution saline par millilitre de culot globulaire. Le liquide a été centrifugé pendant vingt minutes dans une centrifugeuse horizontale à 3 500 t/min. Les surnageants de chaque lavage ont été recueillis et utilisés ensuite pour vérifier l'élimination du plasma humain par ces lavages, ainsi que nous le décrirons plus bas. La couche des leucocytes a été éliminée au cours des lavages.

Après le lavage, les globules rouges ont été lysés par l'adjonction de 3 volumes d'eau bi-distillée à 1 volume de culot globulaire (approximativement  $4\times 10^9$  cellules/ml). Une fois l'hémolyse terminée, la solution est centrifugée à 3500 t/min. pendant vingt minutes afin d'enlever tous les globules rouges non dissous ainsi que d'éventuelles particules figurées. On additionne l'hémolysat de NaCl afin de rendre la solution isotonique (0,9 p. 100), et de merthiolate, comme antiseptique, à une concentration finale de 1 : 10 000.

2º Préparation de stroma et d'hémolysats sans stroma. — L'hémolysat complet est centrifugé à froid pendant une heure à 10 000 t/min., en utilisant une centrifugeuse angulaire. Les stromas sont sédimentés et le surnageant, c'est-à-dire l'hémolysat débarrassé des stromas, a été désigné par Hem/SS.

Les stromas sédimentés sont lavés alternativement dans une solution physiologique et dans de l'eau distillée afin d'enlever l'hémoglobine qui reste encore fixée après la première centrifugation. Un culot presque blanc est ainsi obtenu.

3º Fractionnement de l'hémolysat par du sulfate d'ammonium. — Une solution de sulfate d'ammonium 4 M est préparée en déterminant le poids sec d'une solution saturée, en la diluant convenablement et en la neutralisant avec de l'hydroxyde de sodium. On ajoute goutte à goutte 10 ml de sulfate d'ammonium 4 M à 10 ml d'hémolysats Hem/SS dilué préalablement quatre fois avec de l'eau distillée. Le précipité (Hem/P 20) est centrifugé à 5 000 t/min. pendant quinze minutes et dissous dans 20 ml de solution physiologique. Le résidu insoluble est éliminé par centrifugation. La partie soluble est soumise à deux précipitations successives dans du sulfate d'ammonium 2 M et finalement lavée deux fois dans du sulfate d'ammonium 2 M. Le précipité final très légèrement

brunâtre est dissous dans 2,5 ml de solution saline et cette solution est dialysée pendant une nuit contre de l'eau courante, puis contre de

la solution physiologique.

Le liquide surnageant le précipité Hem/P 20, est dialysé contre de l'eau courante et ensuite contre de la solution physiologique renouvelée deux fois. La couleur de ce liquide (appelé Hem/S 20) est rouge foncé.

- 4º Extrait trichloracétique (Hem/TCA). A la solution Hem/SS diluée au 1:4, on ajoute un volume égal d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Le précipité brun foncé est éliminé par une centrifugation de quinze minutes à 3 500 t/min. Le surnageant incolore est neutralisé avec NaOH, dialysé de la façon décrite ci-dessus, puis concentré par évaporation à basse température au volume initial, c'est-à-dire Hem/SS 1/4.
- 5º Préparation d'extraits de stromas. L'extraction est effectuée en agitant vigoureusement pendant une heure un volume de suspension de stroma avec 2 volumes d'un mélange d'alcool éthylique et d'éther (3:1). L'extrait est lavé trois fois avec une solution physiologique saline, puis concentré à 40° C. Le liquide restant est amené, avec de la solution physiologique, au volume initial de l'hémolysat. On élimine l'éther par chauffage à 35° C.
- 6° Préparation d'extraits salins d'autres organes πumains. Des fragments de foie, de rate et de rein humains, ont été prélevés le plus tôt possible après la mort. Ces tissus, ainsi que des parties de glandes thyroïdes prélevées pendant des opérations, ont été homogénéisés dans un broyeur de Téflon avec un volume égal de solution physiologique ; l'extrait obtenu a été centrifugé à 3 200 t/min. afin d'éliminer toute particule en suspension. Cet extrait a été stérilisé enfin, en le faisant passer à travers une membrane filtrante et conservé à 4° C.
- $7^{\rm o}$  Préparation des immunsérums. Pour la préparation des immunsérums, on a injecté à des lapins par voie sous-cutanée le mélange suivant : (adjuvant de Freund) Hem/c : 4 ml ; huile de paraffine : 3 ml ; Aquafor : 0,5 ml ; bacilles tuberculeux tués : 10 mg.

On mélange l'Aquafor avec l'huile de paraffine et les bacilles tuberculeux au bain-marie à 35° C. On effectue l'émulsion en aspirant et refoulant le liquide dans une seringue et on ajoute l'hémolysat goutte

à goutte.

Chaque lapin est saigné avant l'injection. On procède alors à trois injections de ce type à une semaine d'intervalle. Dix jours après la dernière injection, on fait une saignée d'épreuve, puis on procède à une série de sept injections intraveineuses de concentration croissante, avec l'hémolysat (en commençant avec une dilution à 1:64) tous les deux jours. Une semaine après, les lapins sont saignés à blanc.

Tous les sérums sont additionnés d'antiseptique (merthiolate à

1:10 000) et conservés à 4° C.

8° Les méthodes immunologiques. — Les méthodes utilisées ont été : l'hémagglutination directe au moyen des immunsérums anti-hémolysat, l'hémagglutination passive par fixation des antigènes de l'hémolysat sur

des hématies tannées et non tannées, la double diffusion en gélose selon la méthode d'Ouchterlony [17] et l'analyse immuno-électrophorétique

d'après Grabar et Williams [9, 10, 19, 28].

Dans la majorité des cas, on a effectué cette dernière méthode dans les conditions suivantes : plaques de 4 mm d'épaisseur de gélose à 1,2 p. 100 sur des verres de 13 × 18 cm; tampon véronal, pH = 8,2, force ionique = 0,05; cinq heures d'électrophorèse à la température du laboratoire, 4 à 5 volts/cm dans le gel. Nous avons utilisé aussi des verres de 4,5 × 11 cm, une épaisseur de gélose de 2 à 3 mm et une durée d'électrophorèse d'une heure et demie avec 8 volts/cm. La révélation immunochimique par les divers immunsérums précipitants s'est faite dans des chambres humides maintenues à 18° C. Le séchage et la coloration des films de gélose ont été réalisés par les techniques habituelles [25, 26]. Nous avons également utilisé une coloration qui révèle spécifiquement l'activité peroxydasique de l'hémoglobine [24].

#### RÉSULTATS.

1° Lavage des hématies. — Le premier problème à résoudre était la manière de préparer des hémolysats. Nous avons essayé

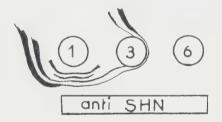


Fig. 1. — Contrôle des liquides de lavage des érythrocytes. 1, 3 et 6 : premier, troisième et sixième liquides de lavage, concentrés. Anti-SHN : immunsérum anti-sérum humain normal.

deux méthodes d'obtention de globules rouges : en utilisant de l'héparine, et par la défibrinisation à l'aide de billes de verre.

a) Dans une première série d'essais, quatre solutions différentes de lavage ont été comparées : solution physiologique de NaCl, solution saline équilibrée (Hanks), tampon phosphate (pH 7,2) et tampon véronal sodique (ces deux derniers ont été rendus isotoniques par addition de NaCl). Dans tous les cas, les résultats se sont révélés comparables en utilisant la réaction des hémolysats avec le sérum anti-hémolysat. Pour contrôler les lavages, on a éprouvé chaque surnageant à l'aide d'un immunsérum de cheval anti-sérum humain afin d'y rechercher la présence de constituants sériques.

La figure 1 montre les résultats d'un tel contrôle du premier, du troisième et du sixième liquide de lavage, fait dans un boîte d'Ouchterlony. Le surnageant du premier lavage réagit fortement avec l'immunsérum, laissant voir plusieurs lignes de précipitation: le troisième liquide de lavage contient encore des traces de constituant du sérum puisqu'on observe une déviation des lignes de précipitation autour du réservoir, tandis que le sixième liquide de lavage est complètement débarrassé de sérum humain.

b) Dans une deuxième série d'essais, et en nous inspirant des expériences de Scheidegger et Bonard [5], nous avons compare d'autres solutions de lavage: NaCl 0,85 p. 100 en eau bidistillée (NaCl) saccharose 10 p. 100 (sucr.), NaCl 0,85 p. 100 dilué 1/100 en saccharose à 10 p. 100 (NaCl in sucr.), solution saturée de phénylbutazone diluée 1/100 en saccharose à 10 p. 100 (phényl in sucr.); tampon phosphate isotonique à pH 9,0 ou 6,3 (phos.).

Les protéines sériques dans les surnageants des lavages ont été détectées cette fois au moyen de sérum de lapin anti-γ-globulines liumaines (en immuno-électrophorèse avec du sérum liumain normal, cet immunsérum révèle aussi des β-globulines). Nous avons préféré l'anti-sérum de lapin à celui de cheval, à cause du phénomène de zone que donne ce dernier.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

# Expérience 11558 :

TUBE	A	В	C	D
Lavages 1, 2, 3, 4.	10 vol. NaCl	10 vol. NaCl	10 vol.	10 vol. sucr.
ŭ	l vol. NaCl ()	1 vol. NaCl (—)	1 vol. sucr. (—)	1 vol. sucr. (—)
6	1 vol. NaCl (—)	1 vol. phényl in NaCl (—)	† vol. sucr. (—)	1 vol. phényl in sucr. (+)

Entre parenthèses sont indiqués les résultats en boîte d'Ouchterlony des surnageants concentrés trois à cinq fois, réagissant envers l'anti-sérum de lapin. Un (+) indique qu'il s'est formé au moins une ligne de précipitation.

Ensuite, nous avons voulu voir si la phénylbutazone avait une

action spécifique dans le lavage :

# Expérience 111658 :

TUBE	A	В	C
Lavages 1, 2, 3, 4.	10 vol. sucr.	10 vol.	10 vol. sucr.
ŏ	1 vol. sucr. (—)	1 vol. sucr. (—)	1 vol. sucr. (—)
6	1 vol. NaCl (++)	1 vol. phényl in sucr. (+)	1 vol. NaCl in sucr. (+)

Cette fois, la réaction en boîte d'Ouchterlony donne des lignes plus intenses après lavage au NaCl pur qu'avec des solutions contenant du sucre.

Le pH des diverses solutions était le suivant :

saccharose pH=8,8; phényl in NaCl pH=6,5; NaCl pH=5,5. L'effet « protecteur » du sucre pourrait être dû à son pH relativement haut, et c'est pourquoi nous l'avons, dans une expérience suivante, remplacé par un tampon phosphate isotonique de pH 9,0.

## L. verience 112758:

TUBE	Α	13
Lavages 1, 2, 3, 4.	10 vol. phos.	10 vol. phos.
	1 vol. phos. (—)	1 vol. phos. (—)
6	1 vol. NaCl (—)	1 vol. phényl in NaCl (—)

Nous avons rencontré de grandes difficultés dans cette expérience à cause du pH élevé entraînant de l'hémolyse, mais les boîtes d'Ouchterlony furent négatives dans tous les cas.

## Expérience 12358 :

Les surnageants d'une série de lavages dans les mêmes conditions que pour l'expérience 112758 ont été soumis à l'immuno-électrophorèse. Une seule protéine est apparue, ayant une mobilité de y lente.

Dans les lavages avec le saccharose seul, on trouve quelquesois des protéines sériques dans le surnageant après 7 lavages. Les globules rouges ont tendance à former des amas et on peut se demander si les protéines libérées à chaque lavage ne sont pas celles qui ont été incluses dans ces amas et libérées lors d'une suspension suivante.

D'autre part, la phénylbutazone ne paraît pas avoir d'action spécifique dans la libération des  $\gamma$ -globulines qui restent fixées sur les globules après lavage au saccharose. Le NaCl est aussi efficace et, en fin de compte, il reste l'agent de choix pour libérer

les érythrocytes des protéines sériques.

La liaison de ces protéines à la surface des hématies semble dépendre du degré d'ionisation de la solution de lavage : si l'ionisation est faible, comme dans le saccharose, les protéines restent attachées, mais si phénylbutazone ou NaCl sont ajoutés au saccharose, certaines protéines sont détachées. On en détache encore davantage dans une solution entièrement ionisée, tel le NaCl ou le tampon phosphate. Le pH ne semble pas avoir d'influence.

Dans les premiers lavages que nous avions faits, nous avons

vu que la ou les protéines libérées par les lavages avaient, en immuno-électrophorèse, une mobilité de γ-globulines des plus lentes. Nous n'avons pas vu de macroglobulines, peut-être par manque d'anticorps correspondants dans notre immunsérum.

c) Cependant, dans une expérience récente qu'il a faite à notre demande, Francq a lavé parallèlement deux portions de 65 ml de culot globulaire, l'une huit fois en saccharose, l'autre huit fois en NaCl. Il a pu mettre en évidence, aux neuvième et dixième lavages (en NaCl dans les deux portions), après concentration par précipitation au sulfate d'ammonium, des  $\gamma$ -globulines,  $\beta_2$  M et  $\beta_2$  A-globulines dans les surnageants de la portion lavée huit fois au saccharose, révélées par immuno-électrophorèse directe et par épuisement de l'immunsérum anti-sérum humain normal. Aux neuvième et dixième lavages des globules lavés d'emblée au NaCl, on ne peut révéler aucune protéine sérique.

Le lavage au saccharose seul est incapable de débarrasser entièrement les globules des protéines sériques, soit qu'il s'agisse d'un effet protecteur plus ou moins sélectif à l'égard des  $\gamma$ ,  $\beta_2$  M et  $\beta_2$  A-globulines, soit que les hématies fixent ces protéines en

présence de saccharose.

D'une manière générale, notre technique de lavage par des solutions salines s'est montrée suffisante pour débarrasser les érythrocytes des constituants plasmatiques : la sixième eau de lavage et les hémolysats des globules ainsi lavés ne contiennent pas de protéine sérique décelable à l'aide d'un immunsérum spécifique.

2º RÉACTIONS IMMUNOLOGIQUES. — a) Plusieurs lapins ont été immunisés avec Hem/c de la manière décrite dans le chapitre « Matériel et méthodes », et leurs sérums, prélevés à différents stades de l'immunisation, ont été étudiés. La première épreuve utilisée a été l'hémagglutination directe, afin de démontrer la présence d'anticorps contre les érythrocytes humains intacts.

Plusieurs dilutions de chaque anti-sérum (volume 0,1 ml) ont été mélangées à un égal volume de suspension d'érythrocytes humains (4 p. 100) de chacun des trois principaux groupes sanguins. Les suspensions ont été laissées à la température du laboratoire, et le degré d'agglutination a été évalué simplement par un examen direct. Les titres trouvés figurent sur le tableau I.

Les sérums de lapin que nous avons utilisés, prélevés avant l'immunisation et dilués au 1/4 n'agglutinaient pas les érythrocytes humains; ils provoquaient cependant une agglutination et même éventuellement une lyse lorsqu'on les éprouvait non dilués. Les sérums prélevés après immunisation contenaient des agglutinines à des titres plus ou moins élevés. Ces anticorps semblent être spécifiques des érythrocytes humains en général, plutôt que d'un groupe sanguin particulier.

Tableau I. — Epreuve d'hémagglutination des sérums de lapins anti-Hem/c.

GLOBULES ROUGES HUMAINS	11	Ī	MMUNSERUM	IS DE LAPINS		
DE :		76	ç	43	94	4
	(1)	(2)	(1)	(3)	(1)	(3)
Groupe A	0(4)	64	0	1024	0	4096
Groupe B	0	64	0	1024	0	2048
Groupe O	i o	64	0	1024	0	4096

(1) Echantillon de sérum avant l'immunisation. (2) Echantillon de sérum après trois injections de l'Hem/c avec adjuvants. (3) Echantillon de sérum après la fin des injections intraveineuses. (4) Pas de réaction avec le sérum de lapin dilué 1:4.

Cette conclusion est confirmée par le fait que l'absorption de l'anti-sérum par des érythrocytes du groupe O élimine les agglutinines contre les trois autres groupes sanguins. Quoique l'anti-sérum n'ait pas été inactivé, il ne se produisait pas d'hémolyse en quantité appréciable pendant les trois heures de séjour à la température du laboratoire.

b) Des épreuves préliminaires ont montré que nos immunsérums contiennent des précipitines pour les constituants de l'hémolysat. Ainsi, Hem/SS a donné une réaction positive (épreuve du disque) jusqu'à une dilution au 1/1 000. Une forte réaction a été observée également avec Hem/S 20 tandis que Hem/P 20 et l'extrait de foie ne donnaient qu'une faible réaction positive. Le sérum humain ne provoquait aucune précipitation visible.

Quelques expériences de mise en évidence d'anticorps ont été effectuées aussi à l'aide de méthodes d'hémagglutination passive d'érythrocytes tannés et non tannés, traités par Hem/c à la température du laboratoire et à 37° C, mais aucun résultat valable n'a été obtenu.

La technique d'Ouchterlony a permis de mettre en évidence plusieurs réactions antigène-anticorps indépendantes entre Hem/c et l'anti-sérum de lapin: on observe au moins cinq lignes de précipitation distinctes (fig. 2). L'une de ces cinq lignes se forme à la limite de la diffusion de l'hémoglobine et apparaît aussi bien avec l'immunsérum qu'avec le sérum normal de lapin. Nous reparlerons de cette précipitation dans le deuxième mémoire de

cette série. Les quatre autres lignes apparaissent seulement avec l'immunsérum et peuvent donc être attribuées à des réactions spécifiques avec des anticorps. Malheureusement, la couleur intense des hémolysats rend difficile l'observation et surtout la reproduction photographique de la précipitation; c'est pourquoi dans la figure 2, ces lignes de précipitation ont été représentées sous forme de schéma.

La fraction Hem/P 20 donne seulement une ligne de précipitation avec le sérum de lapin anti-Hem/c et fournit une réaction d'identité avec le constituant que l'on trouve le plus près du réservoir d'antigène dans la réaction avec Hem/c. Le surnageant de la fraction Hem/S 20 qui ne contient ni les stromas ni les constituants globuliniques donne seulement deux lignes de précipitation. D'autre part, ni l'extrait de stroma par l'alcool-éther, ni le stroma mis en suspension fine par un bref traitement par les

ultrasons, ne produisent de réaction visible.

Pour tenter d'identifier les lignes de précipitation, nous avons utilisé la technique d'absorption des anticorps; généralement un volume d'anti-sérum de lapin a été traité par un égal volume de l'antigène étudié à une concentration convenable. On utilisait ensuite les plaques d'Ouchterlony avec Hem/c comme antigène afin de déterminer le nombre de constituants persistants. Dans le cas de l'absorption par des érythrocytes, l'anti-sérum a été d'abord inactivé à 56° C pendant 30 minutes, puis le culot d'érythrocytes a été ajouté en trois portions successives, séparées chaque fois par

centrifugation, afin d'assurer une absorption complète.

Comme on peut le voir dans le tableau II, l'absorption du sérum par Hem/c, l'antigène homologue, supprime toutes les réactions tandis que l'addition à l'immunsérum de sérum humain normal n'élimine aucune des lignes originales de précipitation. Ainsi, aucun des antigènes dans le Hem/c ne dérive du sérum humain et ne montre de réaction croisée avec celui-ci. L'absorption de l'immunsérum par les érythrocytes, procédé qui supprime complètement les hémagglutinines mentionnées plus haut, ne produit aucun effet sur les lignes de précipitation. D'autre part, les extraits de foie et de rate humains peuvent neutraliser tous les anticorps dans l'immunsérum. Cependant, il ne faut pas oublier que ces deux extraits sont contaminés par le sang, comme l'indique leur couleur rouge foncé. Parmi les sous-fractions de Hem/c étudiées, la fraction globuline Hem/P 20 supprime seulement une des réactions tandis que le surnageant Hem/S 20 épuise tous ou presque tous les anticorps. La précipitation de Hem/c par l'acide trichloracétique élimine tous les antigènes, le liquide restant inactif; il n'absorbe aucun des anticorps présents dans notre immunsérum.

c) Malgré sa grande utilité dans la mise en évidence de plusieurs réactions antigène-anticorps, la méthode d'Ouchterlony présente, dans le cas particulier des hémolysats, deux inconvénients: la couleur de l'hémoglobine rend l'observation des bandes de précipitation très difficile; d'autre part, il est possible que deux ou plusieurs lignes soient situées trop près l'une de l'autre pour que l'on puisse les distinguer. L'analyse immuno-électrophorétique permet de pallier ces inconvénients, car les divers constituants du mélange sont séparés d'après leurs mobilités électrophorétiques, préalablement à la précipitation spécifique, ce qui diminue les

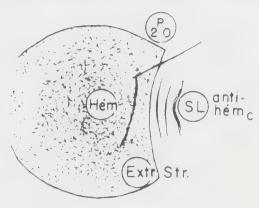


Fig. 2. — Schéma d'une épreuve de précipitation spécifique en milieu gélifié d'après Ouchterlony. Hem : hémolysat total ; Extr. Str. : extrait de stromas ; P. 20 : fraction de l'hémolysat précipitable par le sulfate d'ammonium ; S. L. anti-hem/c : sérum de lapin anti-hémolysat total.

Tableau II. — Epuisement du sérum de lapin anti-Hem/c par des solutions d'antigènes différents, contrôlé à l'aide de la méthode d'Ouchterlony.

ANTIGENE EMPLOYE POUR L'EFUISEMENT	NOMBRE DE LIGNES PURSISTANTES
Solution salée physiologique (témoin)	4
nem/c	0
Sérum humain normal	4
Globules rouges humains normaux	4
Foie humain normal	0
Rate humaine normale	0
Hem/ P 20	3
Hem/ S 20	0 ou 1
Hem/ TCA	4

chances d'une superposition des bandes de précipitation (fig. 3). Tandis que l'hémoglobine, transportée elle aussi par le courant électrique, ne gêne pas l'observation des bandes de précipitation

situées dans d'autres régions.

Quand le Hem/c est examiné par cette technique, le constituant coloré migre dans la zone des  $\beta$ -globulines sériques. Une bande de précipitation se développe à cet endroit en présence soit du sérum normal, soit de l'immunsérum de lapin. Il est à présumer que cette bande est identique à celle que l'on observe également dans les plaques d'Ouchterlony. De plus, l'analyse immuno-électrophorétique permet d'observer 4 à 8 bandes de précipitation selon l'anti-sérum utilisé, les conditions de l'expérience et le temps d'observation. Malheureusement, quelques lignes ont tendance à disparaître très rapidement ; ceci est dû apparemment au faible taux de l'anticorps particulier et à un excès d'antigène. La figure 4  $\alpha$  reproduit schématiquement l'ensemble des lignes observées avec un des meilleurs de nos immunsérums, le n° 943.

Pour aider à l'identification de ces différents constituants, des épreuves directes et des essais d'absorption parallèles à ceux utilisés dans la technique d'Ouchterlony ont été effectués. Les résultats sont résumés dans le tableau III. Afin de simplifier leur description, les bandes de précipitation ont été désignées par des lettres en partant de l'extrémité anodique de la plaque de gel. La ligne c semble être celle qui se forme aussi avec le sérum de

lapin normal.

Le sérum humain normal utilisé comme antigène ne donne aucune ligne de précipitation avec l'immunsérum anti-Hem/c, et l'absorption de ce sérum avec une égale quantité de sérum humain ne supprime aucune des lignes dans la réaction homologue. L'absorption de l'immunsérum avec Hem/c d'autre part, fait disparaître toutes les lignes, ce qui prouve que la technique d'absorption a été convenable. Les extraits de tissus humains examinés, le foie et la rate, semblent avoir au moins deux constituants, b et e. en commun avec le Hem/c (sans prendre en considération la ligne c, probablement non immunologique). Ces deux extraits d'organes et celui du rein ajoutés en excès à l'immunsérum, sont cependant capables de supprimer toutes les réactions de Hem/c avec l'immunsérum anti-hémolysat. Ce fait pourrait être dû soit à la présence réelle de ces antigènes dans les extraits des tissus utilisés, soit à l'inévitable contamination de tous ces extraits par du sang ; une étude spéciale permettrait peut-être de distinguer entre ces deux éventualités.

La précipitation par le sulfate d'ammonium permet d'attribuer la ligne a à une substance possédant les propriétés des globulines (Hem/P 20), puisque cette bande est formée par la fraction isolée par ce procédé et est absente lorsqu'on examine le surnageant

(Hem/S 20). Malheureusement, l'absorption de l'anti-sérum par Hem/S 20 supprime cette ligne de précipitation; ce fait indique que le constituant a n'a pas été complètement précipité par le sulfate d'ammonium. Le surnageant, obtenu après précipitation de l'hémolysat par l'acide trichloracétique, est inactif; il ne donne

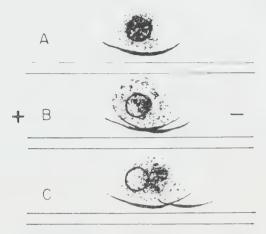
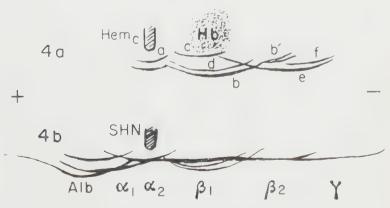


Fig. 3. — Immuno-électrophorèse d'un hémolysat (Hem/SS) révélé par un sérum de lapin anti-hémolysat. Schéma reproduisant l'image de trois plaques de  $4.5\times11$  cm préparées exactement dans les mêmes conditions mais ayant été soumises à des durées croissantes d'électrophorèse. A : diffusion double selon Ouchterlony sans électrophorèse. B : électrophorèse de 1/2 heure. C : électrophorèse 1 heure. On voit que la ligne e, superposée à la ligne b en plaque d'Ouchterlony, se dégage par électrophorèse.



F<sub>IG.</sub> 4. — (a): Analyse immuno-électrophorétique d'un hémolysat (Hem/c) développé par un sérum de lapin anti-Hem/c. Hb: tache de l'hémoglobine. En dessous (b) un schéma représentant les principales bandes formées dans une analyse d'un sérum humain normal (SHN) effectuée dans les mêmes conditions.

Tableau III. — Analyses immuno-électrophorétiques développées avec le sérum de lapin anti-Hem/o.

	8	b	С	UTILIS	p.	0	£
em/c	+	+	+	+	+	+	traces
erum humain normal	-	-	-	-	-	-	***
oie humain normal	-	+	+	-	-	-	-
ate humaine normale	-	+	+	-	-	+	-
ein humain normal	-	+	+	-	-	+	-
hyroIde humaine normale	-	+	-	-	-	+	~
xtrait de leucocytes humains	-	+	-	-	-	-	vole
em/ P 20	+	-	-	-	-	-	~
em/ S 20	-	+	+	-	-	+	-
em/ TCA	-	-	-	-	-	-	-
SOLUTIONS UTILISEES POUR ABSORBER		BANDES	DE P (CC	ON DE L'	N PERSIS	TANT APR	
SOLUTIONS UTILISEES POUR ABSORBER		BANDES	DE P (CC	CIPITATIO	N PERSIS	TANT APR	
SOLUTIONS UTILISEES FOUR AUSORBER L'IMMUNSERUM	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	RES
SOLUTIONS UTILISEES FOUR AUSORBER L'IMMUNSERUM Hem/c	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	RES
SOLUTIONS UTILISEES FOUR AUSORBER L'IMMUNSERUM  Hem/c Serum humain normal	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	RES
SOLUTIONS UTILISEES FOUR AUSORBER L'IMMUNSERUM  Hem/c Serum humain normal Extraits d'érythocytes humains	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	f rac-
SOLUTIONS UTILISEES POUR ABSORBER L'IMMUNSERUM  Hem/c Serum humain normal Extraits d'érythocytes humains Foie humain normal	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	f rac-
SOLUTIONS UTILISEES POUR ABSORBER L'IMMUNSERUM  Hem/c Serum humain normal Extraits d'érythocytes humains Foie humain normal Rate humaine normale	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	f rac-
SOLUTIONS UTILISEES POUR ABSORBER L'IMMUNSERUM  Hem/c Serum humain normal Extraits d'érythocytes humains Foie humain normal Rate humaine normale Rein humain normal	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	f rac-
SOLUTIONS UTILISEES POUR AUSORBER L'IMMUNSERUM  Hem/c Serum humain normal Extraits d'érythocytes humains Fole humain normal Rate humaine normal Rate humain normal Hem/ P 20	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	£ -
SOLUTIONS UTILISEES POUR ABSORBER L'IMMUNSERUM  Hem/c Serum humain normal Extraits d'érythocytes humains Foie humain normal Rate humaine normale Rein humain normal	1	BANDES L'	DE PREC ABSORPTI	CIPITATIO	N PERSIST	TANT APE	f rac-

lui-même aucun trait de précipitation et son utilisation pour absor-

ber l'anti-sérum ne fait disparaître aucune ligne.

Dans une série d'expériences, les relations sérologiques des hémolysats avec les autres éléments sanguins figurés ont été étudiées. Les extraits de leucocytes et de thrombocytes humains normaux ainsi que les immunsérums homologues ont été les mêmes que ceux qui ont été utilisés dans d'autres recherches effectuées dans ce laboratoire [13, 20, 21, 22]. Ces extraits ont été étudiés par l'analyse immuno-électrophorétique en utilisant l'immunsérum anti-Hem/c et, inversement, les immunsérums anti-leucocytes ou anti-plaquettes ont été employés dans des analyses de l'hémolysat. Dans le cas des plaquettes, aucune relation n'a pu être trouvée : l'immunsérum anti-plaquettes ne donne aucune précipitation avec Hem/c, et le sérum anti-Hem/c ne réagit pas visiblement avec l'extrait de plaquettes.

Le sérum anti-leucocytes ne réagissait pas du tout avec Hem/c. Par contre, l'extrait de leucocytes forme une bande de précipitation, bien que très faible, avec le sérum n° 943 anti-Hem/c; son aspect et sa position correspondent à la ligne b de l'hémolysat. Il n'est cependant pas exclu que cette légère bande de précipitation puisse être due à la faible contamination de l'extrait de leucocytes

par des constituants des érythrocytes.

Nous avons essayé enfin de trouver des différences entre les extraits d'érythrocytes normaux et d'érythrocytes anormaux. Pour cela, nous avons préparé Hem/c à partir d'érythrocytes lavés de trois sujets atteints d'anémie hémolytique acquise présentant une épreuve de Coombs postive. La comparaison de ces hémolysats avec des hémolysats normaux, en utilisant un sérum anti-Hem/c, n'a pas révélé de différences évidentes. De plus, la concordance entre les images immuno-électrophorétiques obtenues avec ces trois hémolysats anormaux et celles des normaux examinés, renforce encore l'impression qu'aucun des antigènes mis en évidence n'a de rapport avec les iso-antigènes spécifiques.

#### Discussion.

Lorsqu'on parle de la constitution des érythrocytes, on envisage le stroma et l'hémoglobine, les autres constituants ne sont généralement pas mentionnés; ils correspondent d'ailleurs à une faible

proportion de l'ensemble.

L'hémoglobine, constituant biologiquement très important, est une des protéines les mieux connues du point de vue chimique et biologique. On sait aussi qu'elle est faiblement antigénique. Dans nos premières expériences, aucune des lignes de précipitation formées par la majorité de nos immunsérums et l'hémolysat ne pouvait être attribuée à une réaction de l'hémoglobine avec un anticorps homologue. Parmi les nouveaux immunsérums utilisés. quelques-uns contenaient cependant des anticorps anti-hémoglobine, et donnaient une ligne de précipitation colorée par cette chromo-protéine. En effet, l'immunprécipité qui se forme le premier au niveau de la tache d'hémoglobine, lors de l'immunoélectrophorèse de l'hémolysat, garde, malgré un lavage de plus d'une semaine, une coloration brun-rouge et, par la technique révélant l'activité peroxydasique de l'hémoglobine [24], prend une teinte bleu-violette intense, tandis que la ligne e que révèlent aussi fortement ces immunsérums reste parfaitement incolore.

C'est probablement à l'intensité du précipité que l'on doit la persistance de la couleur de l'hémoglobine malgré un lavage vigoureux. Le précipité spécifique de l'hémoglobine est assez abondant pour s'inscrire en relief dans le film de gélose après séchage de la plaque. Malheureusement, le sérum 943 était épuisé lorsque nous eûmes à notre disposition nos nouveaux lapins, si bien que nous n'avons pu identifier sur une plaque la ligne b décrite avec

le sérum 943, à la ligne d'hémoglobine que donne le sérum 821 par exemple; mais la localisation en face de la tache colorée, l'importance et l'allure en trois segments de la courbe rendent cette identité très vraisemblable.

D'après les connaissances actuelles, le stroma des globules rouges semble se composer de deux protéines principales : stromatine et élinine. La stromatine a été décrite par Boehm [2] comme une molécule de forme allongée capable de former un gel, même à très faible concentration. Calvin [6, 16] et ses coll. séparèrent l'élinine du stroma. Ce constituant présente un grand intérêt, car il semble contenir toute l'activité Rh et la majeure partie des substances A et B des globules rouges.

Quoique ces deux protéines soient relativement insolubles, il n'est pas impossible que l'une ou même les deux puissent être présentes dans nos hémolysats, même après une centrifugation prolongée, soit en solution, soit en suspension colloïdale finement dispersée. Nous espérons pouvoir contrôler dans des études ultérieures si l'une ou l'autre des lignes de précipitation observées en immuno-électrophorèse peuvent être attribuées à ces substances

connues.

L'étude des autres constituants des érythrocytes semble avoir été négligée ou rendue difficile par la prédominance de l'hémoglobine. En effet, elle représente environ 95 p. 100 du poids sec total des érythrocytes et a tendance à contaminer toutes les autres fractions. De toute facon, on sait que les globules rouges renferment des enzymes qui participent à la glycolyse ou à la respiration [18] et probablement d'autres substances intervenant dans le métabolisme et pouvant être antigéniques. Nous avons eu la surprise d'observer une activité catalasique, dans des essais faits par la méthode d'Ouchterlony au cours de la coloration spécifique de l'hémoglobine, au niveau du précipité qui apparaît généralement entre celui de l'hémoglobine et le réservoir d'antigène. Nos travaux récents, qui demandent à être confirmés, semblent permettre d'assimiler ce précipité à la ligne a de l'immuno-électrophorèse. Dans les mêmes conditions, la ligne d'hémoglobine ne montre pas d'activité catalasique.

Par ultracentrifugation, Beams [1] a démontré l'existence de trois constituants des érythrocytes humains différant par leur affinité pour les colorants. Stern et coll. [23] purent identifier deux nouvelles protéines dans les hémolysats de globules rouges humains par électrophorèse en phase liquide. La fraction « a » de ces auteurs semblait dériver de la membrane des cellules et avoir une mobilité anodique dans un tampon véronal de pH 8,6 d'environ 6 × 10<sup>-5</sup> cm²/volt/sec. Cette migration rapide semble être un peu plus élevée que celle du constituant le plus rapide que nous décelons à l'aide de l'immuno-électrophorèse et que nous désignons

par la lettre a. Malheureusement, l'appréciation de la mobilité de cette substance particulière est difficile à cause de la position qu'occupe la bande de précipitation qu'elle forme. Elle semble posséder une mobilité intermédiaire entre les globulines  $a_2$  et les globulines  $\beta_1$  sériques (4 et  $5 \times 10^{-5}$  unités). Si elle dérive vraiment du stroma des cellules, elle pourrait être une protéine fibreuse dont la mobilité serait retardée par la structure du gel. La deuxième protéine décrite par Stern et ses coll. a une mobilité un peu plus lente que celle de l'hémoglobine. Elle pourrait correspondre aux constituants b', e ou f, décelables en immuno-électrophorèse, avec le sérum de lapin 943 notamment.

Les renseignements dont nous disposons actuellement ne nous permettent pas, sauf pour l'arc b, de définir les diverses lignes de l'image immuno-électrophorétique autrement que par leurs mobilités, ou en les comparant à celles des constituants du sérum. Le constituant a dont nous venons de parler est précipité par le sulfate d'ammonium à demi-saturation; il reste près du réservoir de départ et pourrait correspondre à la partie peu soluble du produit étudié. La ligne b qui semble présenter la réaction la plus intense, forme presque toujours un arc double ou même triple; dans ce dernier cas, une partie reste, comme la ligne a, au point de départ, tandis que la seconde partie, qui est immunologiquement identique à la première, migre à la même vitesse que l'hémoglobine : le troisième arc de cette ligne est situé plus en arrière et présente une bifurcation (b') ou une réaction croisée avec un autre constituant plus lent. Notons que la ligne b se dédouble fréquemment, selon les proportions d'anticorps et d'antigène et qu'elle semble constituée par des anticorps non homogènes, répondant à des motifs antigéniques différents de la molécule d'hémoglobine : en effet, lors d'essais d'identification de la ligne b au moyen d'une technique publiée par Lévy et Polonovski [15], et associant l'immuno-électrophorèse à la double diffusion selon Ouchterlony, nous avons observé une réaction d'identité partielle entre la globine purifiée et la ligne b, se développant en marge de la tache d'hémoglobine. D'autres essais selon le même principe, mais avec de l'hémoglobine cristallisée, montrent également une identité immunologique partielle entre cette dernière et l'hémoglobine de l'hémolysat. Nous tenons pour certain que la ligne b est due à l'hémoglobine, mais sa formation est complexe et nous ne pouvons pas encore expliquer, en particulier, sa division en trois arcs de mobilités différentes : s'agit-il de diverses variétés d'Hb présentes dans les mêmes globules (hémoglobines A et F) ou s'agit-il de produits de dénaturation de l'hémoglobine, dus à la conservation (on observe b' surtout avec des hémolysats vieillis)?

La substance d possède à peu près la même mobilité que la

portion principale de b et que l'hémoglobine, mais elle est immunologiquement distincte de ces deux substances. Le constituant qui forme la ligne e possède une mobilité plus faible que les substances b et d; elle correspond à celle des  $\beta_2$  ou des  $\gamma$ -globulines rapides du sérum humain. La ligne « e » est la plus marquée après la ligne « b ». L'anticorps formé contre le constituant « f », qui est le plus lent, semble très faible et la ligne correspondante n'apparaît que dans des conditions d'expérience

optima.

précipitations visibles.

Afin de voir si ces constituants antigéniques sont spécifiques des globules rouges humains ou sont également contenus dans d'autres organes humains, nous avons fait des expériences avec des extraits d'autres tissus. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir des échantillons de tissus préalablement perfusés, et la présence de sang dans toutes les préparations utilisées a rendu difficile l'interprétation des résultats. Nos essais ont montré que les constituants « b » et « e » semblent être présents dans tous les extraits d'organes en quantité suffisamment grande pour donner une réaction positive sous forme d'un arc de précipitation. De plus, les autres constituants des globules rouges doivent être présents dans les différents organes en quantité suffisante pour neutraliser les anticorps respectifs, mais insuffisante pour donner des

De tous les extraits d'organes étudiés, l'extrait thyroïdien était le moins contaminé par le sang, parce qu'il était préparé à partir de matériel prélevé chirurgicalement et non après autopsie comme les autres préparations. En fait, cet extrait ne donnait aucune réaction avec un immunsérum de cheval anti-sérum humain en analyse immuno-électrophorétique, ce qui prouve qu'il n'était pas souillé par du sérum. Toutefois, la présence de deux composants « b » et « e » a pu être décelée à l'aide de l'immunsérum antihémolysat. Ce résultat indiquerait que ces deux antigènes, au moins, sont communs à la fois aux érythrocytes et aux cellules de la thyroïde, et ne sont pas dus à la présence fortuite de sang dans la glande thyroïde. Mais puisque la ligne b, comme nous l'avons montré, est due à l'hémoglobine, que sa formation, il est vrai, est complexe, on peut se demander si le résultat obtenu avec les extraits thyroïdiens s'explique par leur contamination en globules rouges, en dépit de l'absence de constituants plasmatiques, ou par la présence dans le parenchyme d'un antigène très voisin de l'hémoglobine. Les extraits de leucocytes ont été préparés de manière à les débarrasser des protéines plasmatiques ou autant que possible des globules rouges. L'existence très probable d'au moins un constituant commun, le constituant « b », peut faire penser que cet antigène particulier, hémoglobine ou dérivé, est largement répandu dans le corps humain. Le fait que l'image

immuno-électrophorétique n'est pas modifiée par l'absorption d'un sérum anti-hémolysat par des globules rouges intacts, nous permet de conclure qu'aucun des antigenes solubles dans l'hémolysat n'est localisé à la surface de la cellule. De la même manière, les stromas, ou au moins ceux des composants du stroma qui sont insolubles dans nos conditions expérimentales, ne semblent correspondre à aucun des antigènes que nous avons mis en évidence. De plus, l'extrait des stromas par l'alcool-éther est inactif, en dépit du fait que Landsteiner et Van der Scheer [14] aient démontré l'existence d'un antigène spécifique dans l'extrait alcoolique d'érythrocytes de cheval. Nous n'avons pu observer, dans les quelques expériences que nous avons tentées, de différences entre l'image immuno-électrophorétique de l'hémolysat de globules d'un sujet normal et celles obtenues avec des hémolysats d'érythrocytes prélevés à des malades atteints d'anémie hémolytique. En fait, nous n'avons pas pu déceler la présence de globulines du sérum dans ces derniers hémolysats, en dépit de l'existence d'une réaction anti-globulinique fortement positive des érythrocytes entiers. Ces globulines sont certainement fixées sur le stroma et sont éliminées au cours de la centrifugation de l'hémolysat.

Nous supposons que des recherches de ce genre permettront de constater des différences entre des extraits d'érythrocytes normaux et ceux de certains malades, de même que des modifications des protéines du sérum humain sont souvent le reflet de certaines conditions pethologiques.

conditions pathologiques.

#### Résumé.

1º Des lapins ont été immunisés par des hémolysats d'érythrocytes humains soigneusement lavés. Les hémolysats centrifugés ne contenaient pas de constituants sériques décelables par un immunsérum anti-sérum humain normal, et les lapins immunisés n'ont pas formé d'anticorps envers de tels constituants.

2º Les sérums de ces lapins contenaient des agglutinines antiglobules rouges humains, ne présentant pas de spécificité évidente
de groupe sanguin, et précipitaient, même à forte dilution, les
hémolysats. Ils formaient au moins quatre bandes de précipitation
spécifique dans l'épreuve d'Ouchterlony de double diffusion en
milieu gélifié, mais la présence de l'hémoglobine rend l'observation des lignes de précipitation spécifique difficile. L'analyse
immuno-électrophorétique, du fait de la séparation électrophorétique de l'hémoglobine, a grandement facilité l'analyse et nous a
permis de déceler au moins six et parfois huit constituants distincts de mobilité différente. Plusieurs de nos immunsérums de
lapin anti-hémolysat contenaient des anticorps anti-hémoglobine
donnant une ligne de précipitation colorée ayant, au spectrophotomètre, les caractéristiques de l'hémoglobine et donnant une colo-

ration de peroxydase par la méthode utilisant le mélange

α-naphtol et para-phénylène-diamine.

3° Une des bandes de précipitation est formée même par des sérums normaux (voir mémoire suivant); une autre est due à un constituant qui précipite par le sulfate d'ammonium à demisaturation; les autres semblent correspondre à des constituants solubles intra-globulaires encore immunologiquement inconnus. Une au moins de ces substances semble commune avec les leucocytes, et deux au moins, sont probablement présentes dans certains autres tissus humains.

#### SUMMARY

Immunochemical studies on the hemolysates of human red blood cells.

#### I. Analysis of predominant antigens.

- 1. Rabbits were immunized with hemolysates of carefully washed human erythrocytes. The centrifuged hemolysates did not contain constituents detectable by an immune serum to normal human serum. Furthermore, the rabbits immunized with these hemolysates did not form antibodies against such human serum constituents.
- 2. The sera of these rabbits contained agglutinins against human red cells, although not of blood group specificity. These sera precipitated the hemolysates in high dilution and formed at least four specific precipitation bands by the agar double diffusion method of Ouchterlony, but the presence of hemoglobin made difficult the observation of specific precipitation lines. The immunoelectrophoretic analysis, permitting the electrophoretic separation of hemoglobin, greatly facilitated the analysis, and we were able to detect at least 6 and sometimes 8 distinct constituents of different mobility. Several of our rabbit anti-hemolysate sera contained anti-hemoglobin antibodies, giving a coloured line of precipitation having, according to spectrophotometry, the characteristics of hemoglobin and giving a peroxidase colour reaction, with a mixture of  $\alpha$ -naphthol and paraphenylenediamine.

3. One of the precipitating bands was formed against normal serum (see the following report); another was due to a constituent precipitable by half-saturated ammonium sulfate; the others appeared to correspond to the soluble intracellular constituents as yet immunologically unrecognized.

At least one of these substances seems to be common to a leucocyte constituent and at least two are probably present in

certain other human tissues.

Note. — Au moment de la correction des épreuves paraît un article (Rev. Fr. Et. clin. biol., 1959, 4, n° 8, 799) où Boivin et coll. décrivent des résultats analogues aux nôtres et qui confirment notamment notre supposition sur l'hétérogénéité de la fraction Hb. Entre leur nomenclature et la nôtre, on peut établir les correspondances suivantes : leur  $A_1$  = notre b;  $A_2 = b$ ;  $X_1 = e$ ;  $X_2 = f$ ; leur ligne marquée par un ? est notre ligne a (catalase).

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Beams (H. W.). Proc. Soc. exp. Biol., 1947, 66, 373.
- [2] Военм (G.). Biochem. Z., 1935, 282, 32.
- [3] BOIVIN (P.) et HARTMANN (L.). Rev. Fr. Et. clin. biol., 1958, 3, 48.
- [4] BOIVIN (P.) et HARTMANN (L.). Rev. Fr. Et. clin. biol., 1958, 3, 50.
- [5] BONARD (E. L.) et Scheidegger (J. J.). Rev. Fr. Et. clin. biog., 1958, 3, 271.
- [6] Calvin (M.), Evans (R. S.), Behrend (V.), Calvin (G.). Proc. Soc. exp. Biol., 1946, 61, 416.
- [7] CHERNOFF (A.). Blood, 1953, 3, 399.
- [8] CHERNOFF (A.). Blood, 1953, 3, 413.
- [9] Grabar (P.) et Williams (C. A. Jr). *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
- [10] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr). Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 67.
- [11] Grabar (P.). IIIº Congr. Intern. Biochem., Bruxelles, 1956, p. 37.
- [12] Grabar (P.). Adv. Prot. Chem., 1958, 13, 1.
- [13] GRABAR (P.), SELIGMANN (M.) et BERNARD (J.). Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, 548.
- [14] LANDSTEINER (K.), SCHEER (J. van der). J. exp. Med., 1925, 42, 123.
- [45] LEVY (G.) et POLONOVSKI (J.). Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 1293.
- [16] Moskowitz (M.) et Calvin (M.). Exp. Cell. Res., 1952, 3, nº 1.
- [17] OUCHTERLONY (O.). Arkiv Kemi, 1948, 26 B, nº 14.
- [18] PONDER (E.). Hemolysis and related phenomena. J. et A. Churchill, édit., Londres, 1952.
- [19] Scheidegger (J. J.). Bull. Soc. Chim. biol., 1957, suppl.  $n^{\circ}$  1, 45.
- [20] Seligmann (M.). Proc. 5th Colloque Bruges, 1957, Elsevier Publish. Amsterdam, 1958, p. 167-177.
- [21] Seligmann (M.), Grabar (P.) et Bernard (J.). Rap. 7º Congr. Interna. Hématol., Rome, 1958 (à paraître).
- [22] Seligmann (M.), Goudemand (B.), Janin (A.), Bernard (J.), Grabar (P.). Rev. Hématol., 1957, 12, 302.
- [23] STERN (K.), REINER (M.), SILBER (R.). J. biol. Chem., 1945, 161, 731.
- [24] URIEL (J.). Bull. Soc. Chim. biol., 1958, 40, 277.
- [25] URIEL (J.). Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 17.
- [26] Urrel (J.) et Scheidegger (J. J.). Bull. Soc. Chim. biol. 1955, 37, 165.
- [27] URIEL (J.) et GRABAR (P.). Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 427.
- [28] WILLIAMS (C. A.) et GRABAR (P.). J. Immunol., 1955, 74, 158.

# ANTIGÉNICITÉ DES FACTEURS SÉROLOGIQUES DE LA POLYARTHRITE CHRONIQUE ÉVOLUTIVE

par  $M^{me}$  L. PODLIACHOUK, J. C. FRANCQ, A. EYQUEM et F. JACOUELINE (\*).

(Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins, Institut Pasteur et Hôpital des Rhumatisants, Fondation Cittadini, Aix-les-Bains)

Les facteurs sérologiques décelables dans le sérum de 70 p. 100 de sujets atteints de polyarthrite chronique évolutive (P. C. E.) ont été identifiés, tant à l'ultracentrifugation (Kunkel) qu'en immuno-

électrophorèse [11, 12, 13].

Différents travaux ont déjà été consacrés à l'étude de l'antigénicité du facteur rhumatoïde, et on a signalé que des immunsérums obtenus en injectant du sérum ou des euglobulines de P. C. E. étaient capables, soit d'en inhiber l'activité agglutinante, soit de le précipiter spécifiquement. Ces résultats qui n'ont pas été ultérieurement confirmés, nous ont incités à reprendre ce problème [2, 3, 4, 5].

Nous avons immunisé des animaux (lapins et poules), d'une part, à l'aide de sérum total de P. C. E., d'autre part, à l'aide de fractions euglobuliniques, provenant du même type de sérum, ou encore du facteur anti-globulinique ou du facteur agglutinant.

# TECHNIQUES ET METHODES

- 1° Méthodes sérologiques (voir [7, 9, 10, 15]).
- 2º Méthode immuno-électrophorétique (voir [1, 12]).

Les immunsérums obtenus ont été analysés par la méthode d'Ouchterlony et par la méthode d'immuno-électrophorèse de Grabar et Williams, soit sous forme de sérum total ou de globulines concentrées de deux à cinq fois, soit après épuisement, à raison de 2 volumes de sérum humain normal, traité ou non par un culot de globules rouges sensibilisés (« sérum normal traité ») pour un volume d'immunsérum.

(\*) Manuscrit reçu le 15 juillet 1959.

### RESULTATS

# I. — Immunsérums anti-sérum de P. C. E.

A. Lapins. — a) Deux lapins ont été immunisés avec le sérum d'un malade qui présentait, à la réaction de Heller-Svartz, un titre de 1/1~000. L'immuno-électrophorèse effectuée avec ces deux sérums, préalablement concentrés, révèle respectivement 12 et 20 arcs communs au sérum normal et au sérum de P. C. E.; parmi ceux-ci existaient les globulines  $\beta_2$  M et  $\alpha_2$  M, mais non la protéine anti-C (C. R. P.). Ces sérums, épuisés à l'aide de sérum humain normal, ne permettent pas de révéler d'arc de précipitation dans la zone où peut être localisée l'activité agglutinante du sérum de P. C. E.

Cependant, le sérum n° 1 révèle, après épuisement, par la technique d'Ouchterlony, une ligne de précipitation large, d'apparition tardive, proche du réservoir, avec le sérum de P. C. E. de titre élevé.

- b) Deux lapins ont été immunisés avec un mélange de sérums de P. C. E. ayant un titre agglutinant élevé. Les immumsérums révèlent, à l'électrophorèse, respectivement 12 et 14 arcs de précipitation, y compris celui de la  $\beta_2$  M. L'un de ces sérums, après épuisement, garde une ligne de précipitation (Ouchterlony) vis-àvis du sérum de P. C. E. seul, mais la localisation immuno-électrophorétique est différente de celle du facteur.
- B. Poules. L'immunisation de cinq poules a été réalisée avec le sérum total de P. C. E.
- a) Le sérum de deux poules révèle 12 arcs en immuno-électrophorèse ; épuisé par du sérum humain normal traité, il conserve deux anticorps décelables par la technique d'Ouchterlony : l'un, vis-à-vis de sérum normal et de P. C. E. (il ne s'agit pas de protéine anti-C, car la protéine mise en évidence possède une mobilité  $a_2$  et non pas  $\beta_1$   $\beta_2$ , comme c'est le cas pour la protéine anti-C) ; l'autre, se traduisant par une ligne de précipitation floue, large, tardive, caractéristique du sérum de P. C. E., possédant une activité agglutinante.
- b) Le sérum de trois autres poules révèle une quinzaine d'arcs et leur sérum, après épuisement à l'aide de sérum humain normal, précipite encore le sérum de P. C. E., suivant la technique d'Ouchterlony, mais, dans tous les cas, la protéine responsable de cette précipitation n'a pas pu être précisée en immuno-électrophorèse

# II. — Immunsérums anti-euglobulines de P. C. E.

Une purification partielle du facteur agglutinant a été réalisée en précipitant les euglobulines à pH 5,8, avec un tampon de faible force ionique et en réalisant trois précipitations successives.

Alors que l'éluat des globules rouges sensibilisés [15] ayant fixé le facteur agglutinant contient la globuline  $\gamma$ , la  $\beta_2$  M et une  $\alpha_2$ , ces euglobulines contiennent deux  $\beta$  supplémentaires,  $\beta_1$  A et protéine anti-C.

Les immunsérums obtenus chez 5 poules contiennent 13 anticorps y compris, chez deux poules, des anticorps anti-albumine. Ces sérums, après épuisement à l'aide de sérum humain normal, présentent un arc flou avec le sérum de P. C. E. avec la technique d'Ouchterlony. Cet arc correspond à une protéine de mobilité  $\gamma$  et non  $\beta_2$  en immuno-électrophorèse. Le sérum de cinq autres poules, injectées avec un matériel plus purifié, précipite les globulines  $\gamma,~\beta_2$  A,  $\beta_2$  M,  $\beta_1$  A et  $\alpha_2$  M ; deux poules précipitent de plus la  $\beta$  1/4 (révélée par l'immunsérum 491) et l'albumine. Ces cinq sérums ne conservent aucun anticorps après épuisement avec du sérum humain normal.

## III. — Immunsérums anti-facteur antiglobulinique.

A. — Cinq poules ont reçu des injections de particules de latex sensibilisées avec de la globuline F II et ayant fixé le facteur rhumatoïde. Ces immunsérums préparés révèlent en immuno-électrophorèse jusqu'à 10 arcs de précipitation, concernant essentiellement les globulines  $\gamma,~\beta_2$  A,  $\beta_2$  M,  $\alpha$  M. Ceci est attribuable à la multiplicité des protéines capables de s'adsorber non spécifiquement sur le latex et à l'hétérogénéité des globulines F II utilisées.

Ces immunsérums, après épuisement à l'aide de sérum normal, ne possèdent plus d'anticorps pour le sérum de P. C. E.

B. — Huit poules ont été immunisées à l'aide de particules de latex mises en contact avec du sérum de P. C. E. et ayant fixé le facteur rhumatoïde. On sait que le sérum de certains malades atteints de P. C. E. agglutine les particules de latex non sensibilisées. Les immunsérums obtenus précipitent au total 3 globulines  $\alpha_2$ , dont l' $\alpha_2$  M, une  $\beta_2$  et la  $\gamma$ .

Après épuisement à l'aide de sérum normal, l'un de ces sérums garde une ligne de précipitation vis-à-vis du sérum de P. C. E. avec la technique d'Ouchterlony; elle correspond à une globuline de mobilité y.

## IV. — Immunsérums anti-facteur agglutinant.

Deux lapins ont reçu des globules rouges humains sensibilisés, ayant fixé du facteur agglutinant [15]; chaque injection correspondant à la totalité du facteur contenu dans 1 ml de sérum de P. C. E. titrant 1/1 000.

En immuno-électrophorèse, ces immunsérums révèlent tous les deux la globuline  $\beta_2$  M et l' $\alpha_2$  euglobuline, retrouvée dans l'éluat de ces globules rouges sensibilisés, ayant fixé le facteur. Un de ces sérums révèle aussi les globulines  $\gamma$  et l' $\alpha_2$  lipo-protéine.

Ces immunsérums, examinés en double diffusion comme en immuno-électrophorèse, précipitent la globuline  $\alpha_2$  M de Schultze. On est autorisé à conclure que le système des globules rouges sensibilisés entraı̂ne la fixation des globulines  $\gamma$ ,  $\beta_2$  M,  $\alpha_2$  lipo, et  $\alpha_2$  M. Le rôle, dans l'agglutination des globules rouges sensibilisés, de cette  $\alpha_2$  M a été recherché. L' $\alpha_2$  M n'influence pas l'agglutination des globules rouges sensibilisés par un sérum de P. C. E. et ne possède pas à elle seule d'activité agglutinante dans le cas des  $\alpha_2$  M provenant d'un sérum de P. C. E.

L'origine des anticorps antiglobuline  $\gamma$  et anti- $\beta_2$  M obtenus a été discutée. Elle pouvait être attribuée à la présence de globulines adsorbées non spécifiquement sur les globules rouges, lavés trois fois en eau physiologique; on doit admettre qu'il reste à la surface érythrocytaire de la globuline  $\gamma$  mais pas de globuline  $\beta_2$  M en quantité décelable, par une épreuve de consommation de

l'anti-β, M.

#### DISCUSSION

L'étude immunologique des macro-globulines  $\gamma$  a montré qu'elles possèdent une antigénicité différente des  $\gamma$  7 S et que, sans exclure un motif commun (Deutsch, Scheidegger), elles ne pouvaient être

considérées comme un polymère de 7 S.

Les macro-globulines pathologiques rencontrées dans le syndrome de Waldenström, auraient, pour certains auteurs qui utilisent les techniques de précipitation en milieu gélifié, des propriétés immunologiques particulières, caractéristiques de l'individu et du syndrome (Scheidegger).

Pour d'autres (Deutsch, Kunkel), utilisant essentiellement la technique de précipitation quantitative en milieu liquide, ces diffé-

rences ne sont pas évidentes.

Le facteur rhumatoïde ayant été identifié à une macroglobuline 19 S, à l'ultracentrifugation (Kunkel) et à une β<sub>2</sub> M en immuno-électrophorèse [11, 13] et n'étant pas décelable dans le sérum normal, l'hypothèse d'une marque immunologique caractéristique pouvait être envisagée. Les 34 immunsérums qui ont été préparés n'ont pas révélé de différence immunologique entre le facteur et la  $\beta_2$  M du sérum humain normal ou du sérum des sujets présentant un syndrome de Waldenström.

Ces résultats s'accordent avec ceux récemment obtenus par Kunkel [14] avec un immunsérum de lapin anti-« globulines de

P. C. E. séparées électrophorétiquement ».

Ceci bien que :

1° Le sérum de P. C. E. examiné en immuno-électrophorèse à l'aide de certains immunsérums anti-sérum humain normal ou anti-P. C. E. (épuisés par du sérum humain normal) présente fréquemment un arc de précipitation faussement caractéristique qui a été identifié à celui de la protéine anti-C (C. R. P.).

2º Divers immunsérums spécifiques conservent, après épuisement par du sérum normal (traité à l'aide de globules rouges sensibilisés), des images de précipitation, apparemment, caractéristiques du sérum de P. C. E., à l'aide de la technique d'Ouchterlony. Ces images correspondent en immuno-électrophorèse à des protéines de mobilité  $\alpha_2$  ou  $\gamma$ , et non au facteur lui-mème considéré comme une globuline  $\beta_2$  M.

#### Rústvní

L'existence d'une marque immunologique caractéristique du facteur rhumatoïde de la polyarthrite chronique évolutive, assimilé à une macroglobuline, n'a pu être prouvée, au cours de cette recherche effectuée à l'aide de 34 immunsérums de lapins ou de poules. Ces animaux ont été immunisés, d'une part avec du sérum total ou les euglobulines de malades atteints de P. C. E., et d'autre part, avec les facteur agglutinant ou antiglobulinique.

#### SUMMARY

Antigenicity of serologic factors in Rheumatoid Arthritis.

Rabbits and chicken have been immunized on one hand with total serum or euglobulin from patients suffering from rheumatoid arthritis, on the other hand with the agglutinating or anti-globulinic factor. With none of these immune sera it has been possible to demonstrate a special antigenicity of the rheumatoid factor associated with a macroglobulin.



Nous remercions M. Grabar d'avoir bien voulu s'intéresser à cette étude.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BURTIN (P.), HARTMANN (L.), HEREMANS (J.), SCHEIDEGGER (J. J.), Westendorp-Boerma (F.), Wieme (R.), Wunderly (Ch.), Fau-VERT (R.) et GRABAR (P.). Rev. Franç., Etudes clin. et biol., 1957, 11, 161.
- [2] Christian (C. L.). J. exp. Med., 1958, 108, 158.
- [3] CLEVE (H.). Z. Rheumaforsch., 1958. 17, 350.
- [4] EDELMANN (G. M.), KUNKEL (H. G.) et FRANKLIN (E. C.). J. exp. Med., 1958, 108, 105.
- [5] Epstein (V. W.), Engleman (E. P.) et Ross (M.). J. Immunol., 1957, 79, 441.
- [6] EYQUEM (A.). XXXe Congrès Fr. Médecine. Actes, 265-280. Masson, édit., Paris, 1956.
- [7] EYQUEM (A.), FRANCO (J. C.), PODLIACHOUK (L.) et JACQUELINE (F.). Rev. Franç. Etudes clin. et biol., 1960 (sous presse).
- [8] EYQUEM (A.), GUYOT-JEANNIN (N.) et PODLIACHOUK (L.). Ann. Inst. Pasteur, 1959, 96, 295.
- [9] EYOUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.). Diagnostic biologique des rhumatismes inflammatoires chroniques. Editions de la Tourelle, Paris, 1959.
- [10] EYOUEM (A.), PODLIACHOUK (L.) et JACOUELINE (F.). VIº Congrès Soc. Europ. Hématol., Copenhague, 26 août 1957.
- [11] Franco (J. C.). Thèse de Médecine, Paris, 1959. [12] Franco (J. C.), Eyquem (A.), Podliachouk (L.) et Jacqueline (F.). Ann. Inst. Pasteur, 1959, 96, 415.
- [13] Francq (J. C.), Eyquem (A.), Podliachouk (L.) et Jacqueline (F.). Ann. Inst. Pasteur, 1960, 98, 96.
- [14] KUNKEL (H. G.), FRANKLIN (E. C.) et MULLER-EBERHARD (H. J.). J. clin. Invest., 1958, 38, 424
- [15] Podliachouk (L.), Eyouem (A.) et Jacqueline (F.). Ann. Inst. Pasteur, 1957, 5, 644.

# ÉTUDE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE DU FACTEUR RHUMATOÏDE

par J. C. FRANCQ, A. EYQUEM,  $\mathbf{M}^{\mathrm{me}}$  L. PODLIACHOUK et F. JACQUELINE (\*).

(Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins, Institut Pasteur)

Certaines des propriétés des facteurs sérologiques caractéristiques de la P. C. E. ont déjà été précisées. Notamment à l'aide de deux grands groupes de techniques :

1º Agglutination des globules rouges sensibilisés [20];

2° Combinaison avec les globulines F II [7, 9, 10].

Ce groupe de facteurs précipite avec les eugloblines du sérum [22]: à l'ultracentrifugation, il accompagne les macroglo-bulines de constante de sédimentation supérieure à 15 et apparaît constitué comme un complexe que l'on peut dissocier en deux composants ayant des indices de 7 S et 19 S. Certains des caractères immunologiques ont déjà été étudiés [2, 4, 5, 13, 14, 16. 18, 22, 23, 24] et on a recherché notamment l'existence de déterminants antigéniques spécifiques du composant 19 S agglutinant.

Nous avons antérieurement décrit les modifications électrophorétiques décelables chez 42 malades atteints de P. C. E.; elles sont superposables à celles observées au cours des syndromes inflammatoires chroniques [12].

L'analyse immuno-électrophorétique, appliquée à l'étude des éluats, pouvait permettre de préciser encore plus les caractères des protéines responsables des phénomènes sérologiques. Ces protéines pouvaient être obtenues avec un assez grand degré de purification à partir des complexes avec lesquels elles avaient réagi spécifiquement : particules de latex sensibilisées avec la globuline F II, ou globules rouges sensibilisés par un immunsérum et notamment de globules rouges formolés qui peuvent être soumis à différentes techniques d'élution [15].

<sup>(\*)</sup> Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1959

#### I. - Méthodes.

#### 1º Méthodes sérologiques.

- $\hbox{A. Agglutination des globules rouges sensibilisés par un immunsérum:} \\$
- a) Agglutination des globules rouges humains O sensibilisés par un immunsérum de lapin homologue [20].
- b) Agglutination des globules rouges de mouton sensibilisés par un immunsérum de lapin homologue.
- $\it c$ ) Nous avons utilisé d'autres systèmes de globules rouges sensibilisés [47].
  - B. Combinaison avec les globulines F II:
- a) Agglutination des particules de latex sensibilisées par la globuline F II [10].
- b) Agglutination des globules rouges tannés et sensibilisés par les globulines F II [9, 10].

#### 2° Méthodes immunologiques.

- A. Réaction de précipitation en gel (avec simple ou double diffusion).
- B. *Immuno-électrophorèse*, selon Grabar et Williams, en utilisant 0,05 à 0,10 ml d'antigène pour des quantités d'anticorps de 0,8 à 0,2 ml.

#### $R\'{e}actifs.$

#### 1º Immunsérums.

Nous avons employé des immunsérums obtenus chez diverses espèces animales.

- A. Immunsérums anti-sérum humain normal, d'origine :
- 1º Equine: nºs 282, 86, 491 (282 + Coquet), 1299, Estelle.
- 2º Caprine : 4 sérums de chèvre.
- 3° Cuniculaire : 10 sérums de lapin (mélange) ; 4 sérums de lapin anti-euglobulines normales.
  - B. Immunsérums « spécifiques »:
  - 1º Anti-sérum total de P. C. E.: 4 lapins + 5 poules.
  - 2º Anti-euglobulines (trois fois précipitées) de P. C. E.: 5 poules.
  - 3° Anti-facteur agglutinant: 5 poules + 2 lapins.
- 4º Anti-facteur antiglobulinique fixé sur latex : non sensibilisé : 4 poules ; sensibilisé : 5 poules.
  - C. Immunsérums antiglobulines y:
  - 1º Humaine chauffée à 73º: 5 poules; chauffée à 63º: 5 poules.
- 2º De lapin : 5 poules anti-anticorps immuns de lapin fixés sur G. R. de mouton.

2° GLOBULINES.

A. Globulines y humaines (fraction II de Cohn):

Lots 1014 Protein Foundation Harvard 606 Squibb (U. S. Red Cross) [8, 10] globulines  $\gamma$  thérapeutiques Croix-Rouge suisse et hollandaise C. T. R. A., « R ».

B. Globulines y animales:

 $1^{\circ}$  De porc et de bœuf (fractionnées selon la méthode de Cohn, Armour) ;

2º De lapin (précipitées par le sulfate d'ammonium).

#### H. — RÉSULTATS.

La mobilité électrophorétique des facteurs agglutinant et antiglobulinique a été déterminée après avoir soumis à l'électrophorèse, soit le sérum, soit les euglobulines concentrées, provenant de malades atteints de P. C. E. Après électrophorèse, la gélose est découpée en bandes étroites de 3 mm et la séparation gélosetampon est obtenue par congélation (— 40°) et décongélation (37°), suivies de centrifugation rapide.

Dans le liquide d'élution on a évalué:

- a) L'activité agglutinante vis-à-vis de divers systèmes sensibilisés par l'anticorps correspondant : globules rouges humains ou globules rouges de mouton; débutant juste avant la cuve de départ, elle est maximum dans la cuve ou à son voisinage immédiat, côté globuline gamma, et décroît rapidement sur 1,5 cm environ; elle présente donc une mobilité bêta 1;
- b) L'activité antiglobulinique a été recherchée vis-à-vis de particules de latex sensibilisées par une globuline gamma humaine purifiée; elle est retrouvée dans une large zone dépassant la zone bêta 1, à la fois du coté alpha 2 et bêta 2, avec, au cours de certaines manipulations, une image à deux pics d'activité évoquant une distribution hétérogène.

Dans le cas du facteur, cette mobilité bêta 1, ou mieux, cette « absence de mobilité » bêta 1 n'est, a priori, pas suspecte, car les bêta 1 sont réputées contenir les plus grosses molécules du sérum (P. M. 106); de plus, elle a été immédiatement rapprochée de celle présentée par les macroglobulines anormales; elle a été constamment retrouvée au cours d'une vingtaine de déterminations utilisant, soit un sérum de titre élevé, soit des euglobulines concentrées; tout au plus a-t-on pu mettre en évidence le facteur agglutinant sur 2,5 cm, côté globuline gamma, en augmentant la séparation et en perfectionnant l'élution (mais l'arc de bêta 2 M s'étend alors sur 4,5 cm côté gamma, à partir de la cuve de départ et le maximum reste immédiatement accolé à cette der-

nière). Enfin, il est à remarquer que la mobilité « gamma rapide » attribuée au facteur contenu dans le sérum ou ultracentrifugé serait en réalité une immobilité, le maximum d'activité étant au contact du point de départ.

Dans le cas du facteur antiglobulinique, la répétition du découpage-élution a permis de conclure à une mobilité sensiblement identique, aux erreurs expérimentales et à la sensibilité des deux réactions près, les maxima coïncidant entre eux et avec les premiers millimètres après la cuve côté gamma, bien que l'agglutination des particules de latex s'étende au-delà de celle des globules rouges sensibilisés, particulièrement vers la zone alpha 2 qu'elle couvre presque complètement.

# Etude des euglobulines.

Nous avons comparé les euglobulines brutes obtenues par précipitation à pH 5,8 et faible force ionique, suivie de lavages dans le tampon de dialyse, provenant de sujets possédant le facteur agglutinant, et celles provenant de sujets ne possédant pas le facteur agglutinant.

Les euglobulines contiennent toute l'activité agglutinante; en les concentrant vingt fois, le titre agglutinant peut atteindre 1/5 000. Ces euglobulines contiennent des traces de la presque totalité des protéines sériques, et on note la présence des globulines gamma, bêta 2 M, surtout l'apparition de bêta 1/4, bêta 1-bêta 2 et une alpha 2, qui n'existent pas dans les euglobulines normales concentrées de la même façon.

La globuline bêta 1/4 apparaît dans les euglobulines et possède une mobilité voisine de celle du facteur agglutinant, mais l'anticorps qui la décèle peut être épuisé par une quantité sensiblement égale de sérum humain normal et de sérum de P. C. E.

Cette globuline bêta 1 est visible avec des sérums humains présentant une réaction d'hémagglutination négative. L'absorption du facteur agglutinant n'entraîne pas la disparition de cette ligne de précipitation.

La globuline bêta 1-bêta 2 supplémentaire est beaucoup plus intéressante, car elle est décelable dans le sérum possédant un facteur agglutinant de titre élevé, et se retrouve dans les euglobulines. Elle présente la même mobilité électrophorétique que le facteur agglutinant et la même nature euglobulinique.

En réalité, cette globuline bêta 1-bêta 2 a été identifiée à la protéine anti-C (C. R. P.).

En effet, cette ligne ne disparaît pas dans les sérums ayant un titre agglutinant de 1/1 000 lorsqu'on réalise une absorption du facteur agglutinant à l'aide d'un culot globulaire sensibilisé. Le sérum de certains sujets possédant le facteur agglutinant ne

présente pas cette globuline bêta 1-bêta 2.

Elle est absente des globulines précipitables à 32 p. 100 dans le sulfate d'ammonium et dont le titre agglutinant est de 1/1 000 (on sait que la protéine anti-C ne précipite pas dans ces conditions).

Les divers immunsérums (anti-sérum humain normal) qui décèlent cette globuline bêta 1-bêta 2 conservent, après absorption à l'aide du sérum de nouveau-né ou de sérum humain normal, un anticorps qui fournit une image d'identité complète avec deux sérums anti-C. R. P. (l'un commercial, l'autre préparé par le D<sup>r</sup> Seligmann).

Nous avons pratiqué une étude comparative des euglobulines purifiées provenant de malades atteints de P. C. E., en fonction

de la présence du facteur agglutinant.

La précipitation répétée trois à cinq fois, à pH 5,8 et faible force ionique à +4°, permet d'obtenir un matériel qui contient l'essentiel de l'activité agglutinante du sérum. Dans le cas où ces euglobulines proviennent d'un sérum de P. C. E. à réaction d'agglutination positive, on y retrouve les globulines gamma, bêta 2 M, en quantité importante, ainsi que bêta 1-bêta 2 et une alpha 2.

Au contraire, lorsque les euglobulines proviennent d'un sérum normal, on décèle la présence des globulines gamma et, en faible

quantité, bêta 1, bêta 2 et alpha 2.

La fraction du sérum qui ne précipite pas avec les euglobulines contient une certaine quantité de globuline bêta 2 M, bien qu'elle soit dépourvue d'un facteur agglutinant.

# Facteur agglutinant et macroglobulines.

La relation apparaissant entre le taux de macroeuglobulines bêta 2 et le facteur agglutinant nous a conduits à examiner des affections non rhumatismales, s'accompagnant de macroglobulinémie :

1° Sept cas de macroglobulinémie européenne : nous avons observé quatre fois des titres agglutinants inférieurs à 1/32, deux fois 1/64 et une fois 1/128, bien que le taux de macroglobuline fût extrêmement important.

2º Neuf cas de macroglobulinémie réactionnelle provenant d'Africains de race noire (étudiés par les D<sup>rs</sup> Charmot et Vargues, à Brazzaville) et dont le taux de macroglobuline est compris entre 12 et 30 p. 100 : dans 3 de ces cas, les titres agglutinants étaient respectivement 64, 128 et 256.

On voit donc que toutes les macroglobulines n'ont pas auto-

matiquement une activité agglutinante.

# Identification du facteur agglutinant.

Le facteur agglutinant contenu dans 3 ml de sérum de P. C. E. titrant 1/1 000 a été absorbé sur 30 ml de globules rouges humains O sensibilisés par l'immunsérum de lapin correspondant. Ce culot globulaire, après 10 lavages, a été mis en contact avec 0,75 ml d'immunsérum de cheval anti-homme (491). Celui-ci a été examiné en immuno-électrophorèse, vis-à-vis de sérum humain normal et de sérum de P. C. E. On observe que la fixation du facteur agglutinant est superposée à celle de la globuline bêta 2 M. Il y a en même temps fixation d'une petite quantité de globuline gamma sur les globules rouges humains non sensibilisés. Cette fixation de la globuline bêta 2 M ne se manifeste pas dans le cas où on utilise un sérum normal ou un sérum de P. C. E., dépourvu de facteur agglutinant.

La fixation de la globuline bêta 2 M ne se produit pas lorsqu'on utilise des globules rouges ORh+, sensibilisés par un sérum anti-Rh incomplet (anti-C+D) et un sérum de P. C. E. n'agglutinant pas ces globules rouges avant un titre élevé pour les globules rouges O sensibilisés par l'immunsérum de lapin. Lorsqu'il n'y a pas agglutination de ces globules rouges, on observe l'intervention de la globuline gamma, mais celle-ci est attribuable à l'anticorps anti-Rh, fixé sur les globules rouges. Pour étudier avec plus de précision les éléments fixés sur les globules rouges sensibilisés, nous nous sommes servis de globules rouges formolés qui résistent au chauffage à 70° et ne présentent pas d'hémolyse en eau distillée, tout en conservant leur antigénicité.

Les globules rouges formolés recueillis sur solution ACD subissent deux traitements à 37° par le formol à 20 p. 100. Après lavages répétés cinq fois, ils sont sensibilisés par l'immunsérum de lapin. Le facteur agglutinant contenu dans 2,5 ml de sérum, titrant 1'1 000, est fixé sur 20 ml de culot globulaire. On obtient l'élution en tampon phosphatique, à pH 5,5 ou par une solution d'urée 6 M puis 4 M. Après dialyse de l'urée on concentre l'éluat par précipitation à pH 5,5 et à faible force ionique. L'élution par l'urée est plus satisfaisante que celle réalisée en tampon acide. L'éluat contient des protéines humaines décelables par un immunsérum anti-homme. Parmi les premières, on décèle les globulines alpha 2, gamma et bêta 2 M. L'identité de cette dernière a été confirmée à l'aide d'un immunsérum anti-bêta 2 M. Les protéines de lapin contiennent de la gamma-globuline décelable, par un sérum de bouc anti-lapin. Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas action réciproque des anti-sérums : le sérum anti-homme n'agit pas sur la globuline de lapin et le sérum de bouc antilapin n'agit pas sur la globuline humaine. La quantité de globulines bêta 2 M, révélée dans l'éluat, est proportionnelle au titre agglutinant.

On peut établir que 200 ± 50 unités agglutinantes sont nécessaires à la mise en évidence d'un arc de précipitation bêta 2

en immuno-électrophorèse.

La globuline alpha 2 qui se fixe également sur les globules rouges sensibilisés n'est pas nécessaire à l'agglutination; elle se fixe également en l'absence de bêta 2 M, en quantité décelable, avec le sérum normal.

# Identification du facteur anti-globulinique.

Les caractères du facteur ont été étudiés, d'une part, en épuisant l'immunsérum 282 à l'aide de particules de latex sensibilisées par de la globuline humaine F II et le sérum de P. C. E., ou simplement des particules de latex mises en contact avec du sérum de P. C. E., et, d'autre part, par immuno-électrophorèse du liquide d'élution obtenu à partir de globuline humaine F II

agrégée par chauffage.

Les particules de latex, à raison de 1 ml d'une suspension à 30 p. 100, sensibilisées par 10 mg de globuline humaine F II chauffée à 63° pendant dix minutes, ont servi à fixer la totalité du facteur antiglobulinique contenu dans 5 ml de sérum de P. C. E. (donnant une réaction sérologique positive). Ces particules de latex sensibilisées ont été lavées quatre fois, à l'aide de tampon au glycocolle à pH 8,2; après centrifugation elles ont permis l'épuisement de 0,4 ml d'immusérum 282 anti-sérum humain normal.

Cette absorption montre qu'il y a fixation sur les particules de latex sensibilisées de globulines gamma et bêta, ainsi que bêta 1 A et bêta 2 A, et dans ce cas, il n'a pas été possible d'affirmer l'origine de ces différentes globulines, car la globuline F II utilisée contient des traces assez notables de globulines bêta 2 A et bêta 2 M. L'épuisement de l'immunsérum 282 à l'aide de particules de latex sensibilisées avec la globuline F II et mises en contact avec du sérum de P. C. E., doué de la propriété d'agglutiner directement les particules, a été réalisé suivant le même protocole: 1 ml de sérum de P. C. E., comparativement avec celui d'un sujet ne présentant pas de réaction sérologique positive, a été mis en contact pendant deux heures à 56°, avec des particules de latex non sensibilisées. Ces particules ont été lavées quatre fois avec du tampon au glycocolle (pH 8,2 et 0,2 M); elles ont servi à épuiser 0,5 ml de l'immunsérum 282. Au cours de cette épreuve, il y a fixation sur les particules de latex des globulines gamma, bêta 2 M, bêta 2 A et bêta 1 A, tout au moins dans la zone bêta-gamma, qui nous intéresse du fait de la localisation spécifique du facteur de la P. C. E.

Il n'y a entre les sérums à réaction positive et négative qu'une différence de degré, car le sérum à réaction négative se révèle capable de fixer, sur les particules de latex, une quantité notable de bêta 2 M.

# Etude de l'éluat obtenu à partir de globuline F II.

Des globulines humaines F II obtenues selon la méthode de Cohn ont été agrégées par chauffage à 63°, pendant une minute après avoir été mises en solution, à raison de 35 mg/ml. Elles ont été soumises à 3 lavages en eau physiologique, puis à un lavage dans une solution d'urée 4 M. Après 3 lavages dans un tampon au glycocolle à pH 8,2, elles ont été mises en contact pendant une heure à 37°, puis deux heures à 4°, d'une part avec le sérum, d'autre part avec les euglobulines provenant d'un malade atteint de P. C. E. Après 4 lavages avec le tampon au glycocolle et 2 lavages avec la solution d'urée 4 M, on a effectué la dialyse de l'urée contre le tampon au glycocolle, puis le tampon pour immuno-électrophorèse. On a observé que l'éluat obtenu possède une activité agglutinante et antiglobulinique. Cet éluat contient des globulines gamma et bêta 2 M. L'identité de ces lignes est confirmée par l'utilisation d'immunsérums épuisés, d'une part, par la globuline gamma, d'autre part par les globulines gamma et bêta 2 M, ou encore à l'aide de sérum de nouveau-né.

On retrouve ces deux mêmes globulines lorsqu'on se sert, comme réactif, des globulines F II de porc ou de bœuf (Armour)

au lieu de globuline F II humaine.

Il est vrai que les globulines F II utilisées contiennent des traces de globulines bêta 2 M et bêta A. Néanmoins, la responsabilité de la globuline bêta 2 M peut être admise, car l'activité agglutinante qui caractérise le facteur de la P. C. E. apparaît strictement limitée à l'apparition de la ligne de précipitation de la bêta 2 M et leurs maxima coïncident.

De plus, l'analyse immuno-électrophorétique en fluorescence des éluats obtenus a été réalisée après marquage à l'aide de la sulforhodamine, soit de la globuline F II agrégée utilisée comme réactif, soit des globulines de P. C. E. ayant une activité antiglo-

bulinique.

Cette analyse a établi que la globuline bêta 2 M contenue dans l'éluat provenait bien des globulines de P. C. E., tandis que la globuline gamma provenait du réactif.

#### III. — DISCUSSION.

L'ensemble des résultats obtenus permet d'identifier les facteurs responsables des anomalies sérologiques de la P. C. E. à un système réversible bêta 2 M-gamma. On ne peut, jusqu'à main-

tenant, attribuer de marque immunologique particulière à cette globuline bêta 2 M. Les particularités qui ont pu être observées avec les immunsérums spécifiques sont dues à la globuline alpha 2

et à la gamma, qui participent à la réaction.

L'estimation de la quantité de facteur qui intervient dans la réaction varie selon les auteurs; pour Heimer [16], elle serait de 3/100 de gamma, et pour Ziff [19], de 1 gamma. Notre évaluation nous permet d'envisager que le facteur représente 1/10 de gamma pour une unité agglutinante décelable à l'aide du système globules rouges humains que nous utilisons, c'est-à-dire que dans le sérum de P. C. E. à réaction positive il doit exister à 100 gamma de globuline bêta 2 M responsable de l'activité sérologique, soit au maximum 20 p. 100 de la quantité normale de globuline bêta 2 M.

Ceci explique que l'étude immuno-électrophorétique simple des sérums totaux de P. C. E. ne permette pas d'obtenir une image caractéristique pour ceux ayant une réaction sérologique posi-

tive [12, 13, 21].

Au total, le facteur serait représenté par une macroglobuline (bêta 2 M), capable de différentes liaisons réversibles avec les globulines gamma [2].

On peut discuter le mécanisme de cette liaison; on peut envi-

sager:

1° Une altération non spécifique de la globuline bêta 2 M.

2° Une identité du facteur avec une fraction du complément, mais cette hypothèse est définitivement infirmée par les dernières

études immuno-électrophorétiques du complément.

3° On peut aussi considérer la macroglobuline de la P. C. E. comme un auto-anticorps [6]; en effet, la fraction des globulines ayant un indice de sédimentation 19 S contient d'autres anticorps, mais on ignore, pour le moment, les raisons de son apparition. Un caractère analogue a été retrouvé chez certains animaux immunisés par des antigènes bactériens [8]. Dans le cas de la P. C. E., on n'a aucune indication sur la nature des antigènes qui ont pu présider au déclenchement.

#### RÉSUMÉ.

La mobilité électrophorétique en gélose du facteur rhumatoïde évaluée par découpage-élution se localise dans la zone bêta 1 dans le sérum ou les euglobulines, et dans la zone bêta 2 après purification. Grâce à l'analyse immuno-électrophorétique de Grabar et Williams, le facteur peut être identifié à la globuline bêta 2 M.

Cette étude a porté sur les fractions euglobuliniques obtenues par précipitation du sérum de P. C. E. ou des éluats provenant du traitement par l'urée des substrats sur lesquels ont été fixés le facteur rhumatoïde : globules rouges sensibilisés par un immunsérum, particules de latex sensibilisées par la globuline gamma et agrégats de globuline gamma chauffés.

#### SUMMARY

## IMMUNO-ELECTROPHORETIC STUDIES OF THE RHEUMATOID FACTOR.

The electrophoretic mobility of the rheumatoid factor in gel has been studied after elution from the cutting of the agar-agar.

In serum or in euglobulins, this factor is localized in the  $\beta$ 1-globulins; after purification, it is present in  $\beta$ 2-globulins.

By means of Grabar and Williams' technique, the factor can be identified with the β2-M-globulin.

Have been studied: euglobulinic fractions obtained by precipitation of rheumatoid arthritis serum, and eluates of substrates having fixed the rheumatoid factor and treated by urea: sensitized red cells, latex particles sensitized by  $\gamma$ -globulins and heated  $\gamma$ -globulin aggregates.



Nous remercions MM. Grabar et Seligmann de nous avoir aidés de leur expérience, au cours de cette étude.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] Burtin (P.), Hartmann (L.), Heremans (J.), Scheidegger (J. J.), Westendorp-Boerma (F.), Wieme (R.), Wunderly (Ch.), Fauvert (R.) et Grabar (P.). Rev. Franç., Etude elin. biol., 1957, 11, 161.
- [2] CHRISTIAN (C. L.). J. exp. Med., 1958, 108, 158.
- [3] CLEVE (H.). Rheumaforsch., 1958, 17, 350.
- [4] EDELMAN (G. M.), KUNKEL (H. G.) et Franklin (E. C.). J. exp. Med., 1958, 108, 105.
- [5] EPSTEIN (W. V.), ENGLEMAN (E. P.) et Ross (M.). J. Immunol., 1957, 79, 441.
- [6] EYQUEM (A.). XXX<sup>e</sup> Congrès Franç. de Médecine. Actes 265-280. Masson, édit., Paris.
- [7] EYQUEM (A.), FRANCQ (J. C.), PODLIACHOUK (L.) et JACQUELINE (F.).

  Rev. Franç. Etude clin. biol., 1960 (sous presse).
- [8] EYQUEM (A.), GUYOT-JEANNIN (N.) et PODLIACHOUK (L.). Ann. Inst. Pasteur, 1959, 96, 295.
- [9] EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.). Diagnostic biologique des rhumatismes inflammatoires chroniques. Editions de la Tourelle, Paris, 1959.
- [10] EYQUEM (A.), PODLIACHOUX (L.) et JACQUELINE (F.). VI° Congrès Soc. Europ. Hématol. Copenhague, 26 août 1957.

[11] Franco (J. C.). Thèse de Médecine, Paris, 1959.

[12] France (J. C.), Eyquem (A.), Podliachouk (L.) et Jacqueline (F.).

Ann. Inst. Pasteur, 1959, 96, 413.

[13] FRANKLIN (E. C.), HOLMAN (H. R.), MULLER-EBERHARD (H. J.) et KUNKEL (H. G.). J. exp. Med., 1957, 105, 425.

[14] FRANKLIN (E. C.) et KUNKEL (H. G.). J. Immunol., 1957, 78, 11.

[15] FAUCONNIER (B.). Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95, 777.

[16] Heimer (R.) et Federico (O.). Cl. Ch. Acta, 1958, 3, 496.

[17] JOCHEM (E.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, 625.

[48] Kunkel (H. G.), Franklin (E. C.) et Muller-Eberhard (H. J.). J. clin. Invest., 1958, 38, 424.

[19] LOSPALLUTO (J.), LEWIS (A.) et ZIFF (M.). J. clin. Invest., 1958, 37. 913.

[20] Podliachouk (L.), Eyquem (A.) et Jacqueline (F.),  $Ann.\ Inst.\ Pasteur,\ 1957,\ 5,\ 644.$ 

[21] Scheiffarth et Gotz (sous presse).

[22] SVARTZ (N.), CARLSON (L. A.), SCHLOSSMANN (K.) et EHRENBERG (A.).

Acta med. scand., 1958, 160, 87.

[23] VAUGHAN (J. H.). J. Immunol., 1956, 77, 181.

[24] VAUGHAN (J. H.), ELLIS (P. Y.) et MARSCHALL (M.). J. Immunol., 1958, 81, 261.

# MODIFICATION DE LA RÉCEPTIVITÉ DES HÉMATIES ANIMALES ET HUMAINES AUX AGGLUTININES GRIPPALES ET OURLIENNES, APRÈS TRAITEMENT DE CES HÉMATIES PAR LE FORMOL

par B. FAUCONNIER (\*).

(Institut Pasteur, Centre National de la Grippe.)

Il a été montré récemment que le traitement des hématies de souris par le formol augmente d'une manière considérable la réceptivité de ces hématies à l'agglutinine du virus grippal (type B en particulier) et du virus des oreillons [souche BOS] (Fauconnier et Barua [1]).

Le traitement par le formol d'hématies d'autres espèces animales, et leur utilisation dans des expériences d'hémagglutination par les virus du type grippe-oreillons, nous a permis d'effectuer d'intéressantes constatations. Les résultats obtenus font l'objet de la présente note.

### MATÉRIEL ET MÉTHODE.

1º HÉMATIES ANIMALES ET HUMAINES. — Les animaux dont les hématies ont été utilisées sont les suivants : coq, bœuf, cheval, souris, cobaye. Les hématies humaines du groupe O ont également été employées.

Le sang de l'animal est recueilli en présence de citrate de sodium à 1 p. 100. Une partie de ce sang est lavée trois fois en eau physiologique et mise en suspension à la concentration de 0,5 p. 100 dans de l'eau salée (NaCl 0,85 p. 100). Ce sont les hématies normales (HN).

L'autre partie est traitée par l'oxyde de carbone [2] (gaz de ville) pendant dix minutes, puis par le formol de la manière suivante : à 10 ml de sang total dilué de moitié en eau physiologique, on ajoute 4 ml de mélange au demi de formol pur et d'eau deux fois isotonique (NaCl 1,7 p. 100), selon la technique classique de Cox et Pirtle [3]. L'ensemble est placé pendant sept heures au bain-marie à 37° C, puis les hématies sont abondamment lavées en eau physiologique (au moins trois fois dans 20 volumes) pour éliminer le formol non utilisé. Une suspension à 0,5 p. 100 de ces hématies en eau physiologique est préparée. Ce sont les hématies formolées (HF).

<sup>(\*)</sup> Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1959.

2º SOUCHES DE VIRUS. — Ont été utilisées : 2 souches de type A (PR8 et WS), 3 souches de type B (Lee, Vig et B. England), 2 souches de type A1 (FM1 et Thi), 1 souche de type A2 (Sing), 1 souche de type D (Sendaï), 1 souche de la grippe du porc (SW), 1 souche de la maladie de Newcastle (NDV) et 1 souche ourlienne (BOS).

Toutes ces souches sont entretenues par passages en série sur œuf embryonné par voie allantoïque. C'est le liquide allantoïque lui-même

qui est utilisé dans les réactions d'hémagglutination.

3º TECHNIQUE DES RÉACTIONS D'HÉMAGGLUTINATION. — Chaque virus est dilué de demi en demi dans 0,5 ml d'eau physiologique à partir de 1/4. Les suspensions globulaires HF et HN des différentes espèces animales

sont ajoutées à tous les tubes à raison de 0,5 ml par tube.

Les titrages effectués, les tubes sont placés à la température de  $\pm 4^{\circ}$  C (condition essentielle) et la lecture se fait, après un minimum de six heures de sédimentation, par détermination de la dilution limite de virus donnant encore une agglutination 50 p. 100. Les chiffres donnés dans les résultats représentent le dénominateur de cette dilution limite.

## Résultats et discussion (tableau I et fig. 1).

L'augmentation du titre hémagglutinant des virus est particulièrement sensible lorsque l'on compare les résultats obtenus avec les hématies normales et les hématies formolées de souris et de

Type I. — Titres hémagglutinants des différentes souches de virus en présence des hématies normales (HN) et des hématies formolées (HF). Sédimentation à  $+4^{\circ}$  C.

Jouohes de virus	Héma de		Héma de s	ties ouris		aties oobaye		aties boeuf	Héma de o	ties heval		aties Omme
	ЩN	HF	HN	HF	HIN	HF	HIN	HF	HIN	HF	HN	HF
A. PRE	2048	4096	128	4096	256	4096	2048	2048	2048	2048	512	8152
A. WS	2048	4096	SI2	4096	512	I024	< 4	< 4	-	-	256	I024
AI. THI	2048	4056	1024	4096	1024	2048	< 4	< 4	-	-	1024	4096
AI. FLI	I024	2048	64	512	1024	2048	< 4	< 4	_	-	128	128
A2. SING	512	2048	16	128	1024	2048	64	128	_	-	128	128
B. LEE	2048	4096	< 2	I024	64	4096	64	16	512	16	2348	4096
B. ENG	2048	EI92	2	2048	128	4096	1024	513	2048	256	128	512
B. VIG	512	I024	2	512	512	8192	2048	1024	32	< 4	1024	4096
D. JEND	4096	8192	1024	4036	1024	4096	I024	512	_	-	I024	4096
3W	-	-	16	€4	1.8	512	320	€4	32	16	64	256
NDV	-	-	-	***	512	512	256	512	-	-	512	512
BO3 (oreillons)	256	IG24	2	256	64	512	256	128	64	158	-	-

cobaye. Les hématies provenant de ces deux espèces animales se comportent d'une manière à peu près semblable pour tous les virus étudiés. Après traitement par le formol, elles deviennent de quatre à mille fois plus agglutinables par les virus du groupe B que ne le sont les hématies fraîches de même espèce.

L'action favorable du formol est également sensible, mais à un moindre degré, avec les hématies de coq et d'homme.

Quant aux hématies de bœuf et de cheval, les résultats sont variables. Il semble que le formol ait une action nettement défavorable, principalement sur les hématies de cheval. Les hématies

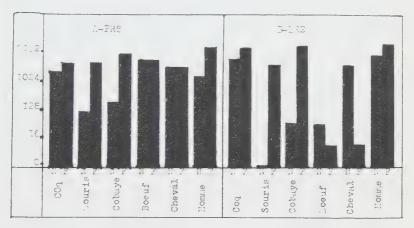


Fig. 1. — Titres hémagglutinants des souches de virus grippal A-PR8 et B-Lee en présence d'hématies fraîches et formolées provenant de 5 espèces animales et de l'homme. N: Hématies fraîches 0,5 p. 100; F: Hématies formolées 0,5 p. 100; Température des réactions: + 4°C.

de bœuf sont inagglutinables, aussi bien avant qu'après action du formol, pour toutes les souches du groupe A1. Ce phénomène est en rapport avec l'existence d'inhibiteurs sériques vis-à-vis de ce groupe dans le sang de bœuf normal.

Ces résultats généraux montrent clairement que le formol peut conférer un pouvoir réceptif à des hématies qui n'en ont pas normalement pour un virus défini, ou augmenter, parfois d'une manière considérable, ce pouvoir réceptif chez des hématies qui n'en sont que légèrement pourvues.

Mais le traitement au formol peut aussi agir dans le sens d'une diminution des récepteurs cellulaires. A la suite de l'action du formol, on ne peut donc parler que de « modification » des récepteurs (en plus ou en moins). Il semble que cette « modification » soit étroitement sous la dépendance, d'une part de l'espèce ani-

male qui a fourni les globules, et d'autre part du type ou de la

variété du virus en cause.

Nous avions espéré que le traitement par le formol des hématies de certaines espèces animales pourrait favoriser l'augmentation ou même l'apparition de propriétés réceptives chez ces hématies vis-à-vis d'autres types de virus que ceux du groupe « grippe-oreillons ». Buckland [4], rapportant les résultats d'expériences pratiquées avec quelques souches de virus non grippaux (adénovirus, virus S. K. et virus ECHO) constate en général une nette diminution des récepteurs des hématies de mouton et d'homme après traitement par le formol. Malheureusement les réactions ont été effectuées à la température du laboratoire, alors que la température recommandée est de +4° C. Au-dessus de +10 à +15° C on observe en effet très souvent, avec les hématies formolées, des phénomènes d'élution spontanée rapide qui faussent la lecture finale et peuvent même donner lieu à des résultats inverses de ceux obtenus à +4° C. Nous avons nous-même constaté ce fait avec des hématies de souris qui ne voyaient leur potentiel réceptif accru, pour certaines souches de virus grippal, que dans le cas où les réactions d'agglutination étaient effectuées à basse température. Cette condition d'expérience est donc tout à fait essentielle et nous ne saurions trop insister sur ce fait. Quoi qu'il en soit, les hématies de mouton (observations non rapportées ici en détail) nous ont donné des résultats analogues à ceux obtenus avec les hématies de bœuf, c'est-à-dire allant dans le sens d'une diminution des récepteurs, avec les virus du type grippe-oreillons.

D'autres recherches sont donc nécessaires pour déterminer quelles sont les espèces animales dont les globules peuvent être traités avec profit et quels sont les virus qui peuvent bénéficier

de ces « modifications » globulaires.

La présente note est une simple contribution aux recherches qui tendent à modifier dans un sens favorable les récepteurs des hématies animales de manière à faciliter la détection virale dans un milieu liquide.

Bien que nous puissions dire dès à présent que le formol, en dehors de ses autres effets (conservation par exemple), ne modifie pas d'une façon générale les récepteurs cellulaires dans un sens favorable, il est certain que dans des cas limités (dépendant aussi bien du type de virus que de l'espèce globulaire) et dans des conditions d'expérimentation définies (+4° C), son action peut être mise à profit pour augmenter la réceptivité globulaire.

Comment agit le formol pour modifier ainsi les récepteurs des hématies? Il est possible, en ce qui concerne les hématies de cobaye, de souris et de coq, que le formol ait une action favorable en réduisant la charge négative de surface de l'hématie. Mais ceci n'est qu'une hypothèse et le fait qu'on ait trouvé des résultats discordants avec les hématies de cheval, de bœuf et de mouton complique singulièrement le problème. S'il s'agit d'une modification des charges globulaires, il serait intéressant de déterminer les charges des hématies des différentes espèces animales avant et après traitement par le formol. Certaines recherches ont été pratiquées dans cette direction sur des hématies fraîches [5, 6]. Elles ne permettent pour l'instant, bien entendu, aucune conclusion.

#### RÉSUMÉ.

Après traitement par le formol, les hématies de cobaye et de souris sont remarquablement plus sensibles aux agglutinines des virus du groupe « grippe-oreillons » que ne le sont les hématies fraîches de la même espèce.

Ces résultats sont particulièrement nets avec les virus grippaux du type B et ne sont obtenus que lorsque les réactions d'hémagglutination sont effectuées à la température de +4° C.

Le formol exerce également une action favorable sur la réceptivité des hématies de coq et d'homme, mais à un moindre degré. Son influence est au contraire néfaste sur les hématies de cheval et de bœuf, puisqu'il produit une diminution de la réceptivité de ces hématies.

## **SUMMARY**

Modification of hemagglutinability of animal and human erythrocytes after treatment with formalin.

After treatment with formalin, the hemagglutinability of erythrocytes by influenza and mumps viruses is modified (at  $+4^{\circ}$  C) as compared with the hemagglutinability of fresh erythrocytes. In guinea pigs and mice erythrocytes, it is strongly enhanced, particularly for type B and mumps viruses. Treatment by formalin also favours the hemagglutinability of fowl and human red cells, but at a lower degree.

On the contrary, the hemagglutinability of horse and bovine erythrocytes decreases after formalin treatment.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] FAUCONNIER (B.) et BARUA (D.). Nature, 1959, 183, 629.
- [2] FAUCONNIER (B.). Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95, 777. [3] Cox (C. D.) et Pirtle (E. C.). Proc. Soc. exp. Biol., 1956, 93, 373.
- [4] BUCKLAND (F. E.). Nature, 1959, 183, 1276.
- [5] ABRAMSON (H. A.) et MEYER (L. H.). J. gen. Physiol., 1936, 49, 601.
- [6] BATEMAN (J. B.) et ZELLNER (A.). Arch. Bioch. Bioph., 1956, 60, 44.

# MISE EN ÉVIDENCE, EN CULTURES DE LA SOUCHE CELLULAIRE HeLa, DE L'INFECTION ECTROMÉLIQUE LATENTE CHEZ LA SOURIS

par G. BARSKI et Fr. CORNEFERT (\*).

 $(Institut\ Gustave\ Roussy,\ Villejuif\ [Seine])$ 

L'introduction dans les cultures in vitro de la souche cellulaire HeLa d'un broyat d'organes de souris dans le but de découvrir un présumé virus humain inoculé à cette souris, nous a conduits fortuitement à l'isolement à partir de cette souris, apparemment normale, du virus de l'ectromélie.

Ce genre de substitution d'un virus ectromélique à un virus recherché par passages sur souris est connu comme un accident assez fréquent dans les laboratoires de virologie [1, 2, 3, 4]. Nous étions cependant frappés par la haute sensibilité des cellules HeLa en tant que détecteurs de ce virus ainsi que par l'aspect caractéristique et facilement reconnaissable des lésions qu'il provoque dans ces cultures.

A la suite de ces constatations, nous avons entrepris, avec un virus d'ectromélie connu, de déterminer de plus près les possibilités de mise en évidence à l'aide des cultures des cellules HeLa ou d'autres cultures de cellules humaines d'infection ectromélique latente chez des souris ne présentant pas de symptômes cliniques ni de signes histopathologiques spécifiques de cette infection.

(\*) Manuscrit reçu le 10 juillet 1959.

## LEGENDE DE LA PLANCHE

- Fig. 1. Culture vivante de la souche cellulaire HeLa trois jours après infection avec le virus d'ectromélie (souche « Sandom », troisième passage). Aspect caractéristique de rétraction par placards. Optique de fond clair. Gross.  $10\times6,3$ .
- Fig. 2. Même culture que fig. 1 fixée et colorée à l'hémalun éosine. Les placards sont constitués par des cellules géantes à noyaux surtout périphériques. Nombreux corps d'inclusion cytoplasmiques. Gross.  $6.5 \times 6.3$ .
- Fig. 3. Même culture que fig. 2, les corps d'inclusion se distinguent par leur caractère homogène bien délimité, ainsi que par l'aspect « en relief ». Gross.  $50\times6.3$ .

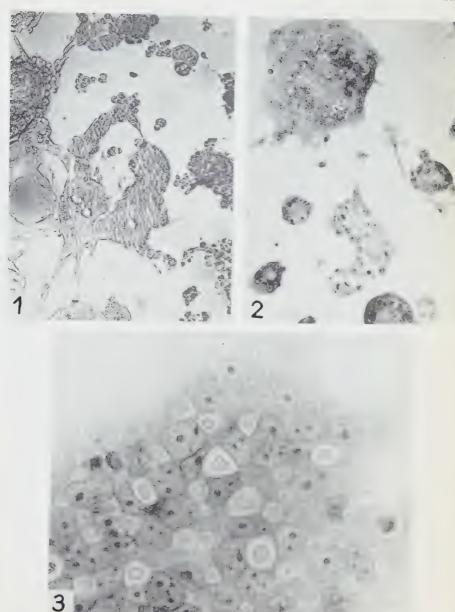


Planche I.

MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS



## Matériel et méthodes.

Cultures cellulaires. — Nous nous sommes servis de la souche cellulaire HeLa reçue du Dr Goffe, de Londres, en 1954 et entretenue depuis dans notre laboratoire sans interruption. Nous avons utilisé accessoirement d'autres cultures, celles de l'amnios humain, du tissu embryonnaire mixte de souris, de la tumeur mammaire spontanée de souris C<sub>3</sub> H et de la souche de fibroblastes de souris L (Earle). Nous avons employé dans ces cultures soit le milieu à base de lactalbumine et d'extrait de levure, soit le milieu à l'hydrosat de caséine de Lépine et coll. [5], tous deux complétés de 15 p. 100 de sérum de cheval décomplémenté. Le procédé de culture en tubes aplatis à lamelle [6] ainsi que les procédés de fixation et de coloration ont été décrits précédemment.

Virus. — La souche « Sandom R 55.13 » du virus d'ectromélie nous a été aimablement envoyée par le Dr Dalldorf. Après un seul passage sur souris par voie intracérébrale, cette souche s'est montrée immédiatement adaptable et transmissible en série en cultures de la souche HeLa.

Les contrôles d'infectivité de cette souche, après passages *in vitro*, étaient effectués parallèlement en cultures cellulaires et par inoculation intracérébrale ou intrapéritonéale aux souris selon les méthodes habituelles.

Les souris utilisées au cours de ces expériences appartenaient à la lignée « Swiss » non consanguine, d'élevage en colonie fermée.

## Résultats.

Les lésions qui apparaissent dans les cultures de la souche HeLa à la suite d'introduction d'une émulsion soit de cerveau, soit de foie et de rate de souris ectroméliques, débutent vers le troisième jour par une agglomération de cellules par foyers, et une rétraction de la nappe cellulaire, souvent avec formation de placards de cellules confluentes qui se révèlent être, après fixation et coloration, des cellules géantes comptant plusieurs dizaines de noyaux (pl., fig. 1 et 2). La structure de ces cellules géantes a ceci de particulier que les noyaux ont tendance à se grouper en chapelet autour d'un espace cytoplasmique vide, ce qui les distingue des cellules géantes observées dans les cultures cellulaires infectées avec d'autres virus.

Des cellules isolées, mais surtout celles qui font partie des plasmodes, montrent à partir du deuxième jour d'infection de nombreuses inclusions intracytoplasmiques caractérisées par leur aspect compact, homogène, et « saillant », souligné par un halo qui les entoure régulièrement (pl., fig. 3). Ces inclusions apparaissent comme acidophiles après coloration à l'hémalun-éosine et accusent une brillance rouge particulière si on les colore avec un mélange de bleu de méthyle et d'éosine de Mann.

Dans les cultures infectées avec des doses limites de virus les foyers d'infection ont d'abord tendance à rester localisés. Ils s'élargissent ensuite progressivement, se multiplient et finissent toujours par envahir la culture entièrement et la détruire. Cela se produit, selon la concentration du virus dans l'inoculum, en cinq à huit jours. A ce moment, le milieu surnageant de la culture contient de 10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup> DI 50 par millilitre déterminées par titrage en cultures de la souche HeLa. L'infectivité exacte de ce même matériel pour la souris, quoique plus difficile à déterminer à cause des variabilités individuelles de sensibilité de ces animaux au virus, paraît être du même ordre.

Nous avons effectué dans l'ensemble sept passages du virus (souche Sandom) en cultures de cellules HeLa. L'inoculum de départ (émulsion de cerveau de souris ectromélique) a été dilué au cours de ces passages au moins 10<sup>10</sup> fois et le surnageant du dernier passage dilué dix fois s'est montré à l'inoculation aux souris tou-

jours hautement infectant.

Les cellules HeLa infectées avec le virus ectromélique au quatrième passage et examinées en coupes ultraminces au microscope électronique ont révélé la présence, dans le cytoplasme, de nom-

breuses particules virales caractéristiques (1).

Afin de comparer in vitro la sensibilité au virus ectromélique de cellules de différentes origines, nous avons infecté simultanément et avec le même échantillon viral à différentes dilutions, des cultures de la souche HeLa, de la souche de fibroblastes de souris L, ainsi que des cultures fraîches d'amnios humain et celles de la tumeur mammaire de souris C<sub>3</sub> H.

Nous observons en cultures primaires d'amnios humain des résultats très comparables à ceux en souche HeLa en ce qui concerne l'aspect des lésions, la rapidité de leur évolution et la sensibilité au virus déterminé par le point final des titrages du virus. En revanche, dans les cultures primaires d'épithélium tumoral de souris, les lésions apparaissent plus tardivement et le point final du titrage est en moyenne plus bas que celui en cultures des cellules HeLa. Dans les cultures des cellules du conjonctif de souris, préparées par trypsination du muscle et de la peau d'embryons, ou en cultures de la souche L de Earle, les résultats d'inoculation du virus ectromélique sont plus difficiles à évaluer : les lésions évoluent lentement et le processus infectieux n'est souvent guère reconnaissable qu'après fixation et coloration, ou encore après passages consécutifs en cultures de la souche HeLa.

En vue de prouver la possibilité d'isolement du virus à partir d'organes de souris en état d'infection inapparente, nous ayons

<sup>(1)</sup> Données non publiées obtenues en collaboration avec les Docteurs Dourmashkin et Bernhard, au Service de Microscopie Electronique de l'Institut de Recherches sur le Cancer à Villejuif.

inoculé par voie intrapéritonéale, un certain nombre de souris avec des doses limites de virus. Ainsi, dans une expérience type, parmi 10 souris inoculées, chacune avec 10 doses infectantes pour cultures HeLa, 2 souris ont présenté des signes cliniques habituels d'infection. Les autres, qui ne montraient aucun symptôme évident ont été sacrifiées entre le quinzième et le vingt-deuxième jour. Leurs foies et rates, macroscopiquement normaux, n'ont montré à l'examen histologique aucune anomalie spécifique (2). Le broyat de ces organes dilué au 1/10 en solution physiologique a été introduit dans des cultures de la souche HeLa. Au cours de cette expérience, le virus a pu être ainsi décelé dans les organes de trois souris sur huit. Des tentatives analogues d'isolement de virus ont été entreprises au cours d'autres expériences, chaque fois avec un certain nombre de résultats positifs à partir des souris ne présentant ni symptômes ni lésions spécifiques identifiables d'ectromélie.

## DISCUSSION.

On observe couramment au cours des épidémies d'ectromélie dans les élevages de souris qu'un certain nombre d'individus échappe à la maladie [7, 8]. Ces individus présentent souvent par la suite des anticorps circulants spécifiques acquis très certainement grâce à une infection inapparente. Briody et coll. [9] analysant l'allure de plusieurs épidémies qui ont atteint les élevages de Pittsburgh et de Buffalo, arrivent à la conclusion que des animaux subissant une infection asymptomatique, et parmi eux des jeunes souris possédant encore des anticorps maternels, se trouvent être une des sources essentielles de diffusion de ce virus.

Cependant, ces auteurs [9, 10], comme d'autres [4], soulignent l'absence d'une méthode pratique et sûre de détection de l'infection ectromélique latente chez la souris. La recherche des lésions histologiques apparaît ici comme un moyen insuffisant; nous venons de le démontrer directement en isolant le virus à partir des souris dont les organes (foie et rate) ne présentaient aucune lésion spécifique d'ectromélie. Les tests sérologiques sont, pour des raisons évidentes, peu concluants en matière de détection d'infection en cours. Enfin, les tentatives de déceler le virus par des inoculations croisées de souris à souris, représentent un moyen aussi risqué, à cause de la diffusion facile de la contagion à travers l'élevage, qu'incertain, à cause de la réceptivité très variable des souris à l'infection ectromélique. Cette variabilité est en effet

<sup>(2)</sup> Nous tenons à remercier le D<sup>r</sup> Sacquet, du Centre de Sélection des Animaux de Laboratoire à Gif-sur-Yette, pour la contribution compétente et désintéressée qu'il nous a apportée à la lecture et l'appréciation des coupes histologiques en provenance de nos souris d'expérience.

conditionnée aussi bien par le génotype de l'animal inoculé [10]

que par son contact antérieur possible avec le virus.

L'utilisation des cultures de la souche HeLa ou celles de l'amnios humain, comme moyens de détection d'infection ectromélique latente, semble apporter à ce problème une solution à la fois pratique, sûre et rapide.

La culture in vitro du virus ectromélique a été réalisée pour la première fois avec certitude par Downie et Mc Gaughey [11] en présence de tissu embryonnaire de souris. Nauck [12] a obtenu une multiplication du même virus in vitro dans des cultures d'épithélium cornéen de lapin. Des auteurs japonais [13] ont utilisé à

cette fin, des cultures d'ascite tumorale de souris.

Au cours de nos expériences, nous avons constaté une sensibilité remarquable au virus ectromélique des cultures de cellules épithéliales humaines, qui dépasse même celle des cultures de différents tissus de souris. Une telle « hétérosensibilité » est d'autant plus frappante qu'il n'existe aucune preuve de réceptivité des humains vis-à-vis du virus ectromélique malgré le contact fréquent de l'homme avec les souris infectées. D'ailleurs une preuve directe de l'insensibilité de l'homme au virus ectromélique est rapportée par Saunders [8] à propos d'une expérience involontaire d'inoculation de plusieurs centaines de milliers de personnes avec un virus ectromélique vivant contenu dans un vaccin antityphique. Cependant, on peut citer d'autres cas de sensibilité in vitro à un virus de cellules provenant d'une espèce non réceptive, celui, par exemple du virus de la rhinotrachéite des bovins et des cellules humaines [14].

Les lésions cellulaires causées en cultures de cellules humaines par le virus d'ectromélie peuvent être considérées comme specifiques et aisément reconnaissables. Les corps d'inclusion intracytoplasmiques dus à ce virus se distinguent par leur caractère particulièrement homogène, compact et brillant à la coloration; ils diffèrent dans ce sens des corps du Guarnieri, produits in vitro dans des conditions analogues. Cette distinction a été faite déjà sur un autre matériel cellulaire par Nauck [12]. L'apparition des cellules géantes dans les cultures cellulaires infectées avec différents virus peut être considérée d'une manière générale comme un phénomène assez répandu, observé entre autres avec les virus de la rougeole [15], de la varicelle [16] et de l'herpès [17]. Cependant les cellules géantes dues au virus ectromélique font apparaître une nette tendance à l'arrangement circulaire des noyaux autour des espaces cytoplasmiques vides.

Toutes ces particularités cytopathologiques peuvent faciliter considérablement l'isolement et l'identification du virus ectromélique à l'aide des cultures des cellules humaines, habituellement disponibles dans les laboratoires de virologie ou de cancérologie.

Ce moyen paraît applicable aussi bien à la détection des infections ectroméliques latentes qu'à la distinction des infections fortuites dues à ce virus et qui se superposent parfois à l'expérimentation conduite sur les souris pour d'autres fins.

## Résumé.

- 1° On peut réaliser en cultures in vitro de la souche cellulaire humaine HeLa une multiplication et des passages en série du virus de l'ectromélie avec apparition dans ces cultures de lésions spécifiques, facilement identifiables.
- 2° Ces lésions consistent essentiellement : a) en rétraction de la nappe cellulaire avec formation de multiples cellules géantes dont les noyaux ont tendance à se grouper en bordure d'un espace cytoplasmique vide ; b) en apparition de nombreux corps d'inclusion cytoplasmiques particulièrement homogènes et bien délimités, d'affinité tinctoriale éosinophile. Par leur fréquence, leur netteté et leur aspect « saillant » ces inclusions diffèrent des corps de Guarnieri observés dans des conditions analogues avec le virus vaccinal.
- 3º Des cultures de cellules amniotiques humaines accusent la même sensibilité au virus ectromélique et présentent les mêmes lésions que les cellules HeLa. Par contre, l'effet cytopathogène obtenu en cultures de la souche de fibroblastes de souris L, ou en cultures primaires du tissu embryonnaire ou du tissu tumoral (adénocarcinome) de souris est moins régulier et plus difficilement identifiable.
- 1º L'introduction dans des cultures de la souche HeLa du broyat de foie et de rate de souris infectées avec le virus ectromélique mais ne présentant ni signes cliniques ni lésions histologiques de la maladie, a permis à plusieurs reprises, l'isolement et l'identification du virus ectromélique.
- 5° La valeur de cette méthode de mise en évidence d'infection extromélique latente est discutée.

## SUMMARY

# DEMONSTRATION IN HeLa CELL CULTURES OF LATENT ECTROMELIA INFECTION IN MICE.

- 1. Regular multiplication and serial passages of the ectromelia (mouse pox) virus can be obtained in human HeLa cell cultures.
- 2. This multiplication is accompanied by the appearance in the infected cultures of specific cell lesions which are essentially: a) retraction of the cell sheet with generalized formation of giant

cells in which the nuclei are grouped predominantly at the periphery of empty cytoplasmic spaces; b) presence of numerous well delimited eosinophilic inclusion bodies surrounded by a clear halo; these inclusion bodies appear more homogeneous and compact than the Guarnieri bodies seen in vaccinia virus infected HeLa cultures.

- 3. Human amniotic cell cultures are as sensitive to the ectromelia virus as the HeLa strain and show, when infected, the same kind of cell lesions. Less regular results are obtained with strain L (Earle), mouse fibroblasts or mouse embryo, and mouse (C<sub>3</sub> H strain) mammary carcinoma cell cultures.
- 4. Several isolations of ectromelia virus could be easily performed when homogenized liver and spleen tissues taken from infected mice with no clinical nor histological signs of ectromelia were introduced in HeLa cell cultures.
- 5. The value of tissue culture method applied to the discovery of latent extromelia infections in mice is discussed.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] KIKUTH (W.) et GÖNNERT (R.). Arch. Virusf., 1940, 1, 295.
- [2] BARBIERI (D.) et GENESI (M.). Boll. Soc. Ital. Biol. sper., 1953, 29, 1926.
- [3] Ioffe (B. I.). J. Microb. Epid. Immun. (russe), 1954, no 7, 57.
- [4] DALLDORF (G.) et GIFFORD (R.). Proc. Soc. exp. Biol., 1955, 88, 290.
- [5] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (Ph.) et PACCAUD (M.). Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 654.
- [6] Barski (G.). Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 512.
- [7] FENNER (F.). J. Immunol., 1949, 63, 341.
- [8] SAUNDERS (L. Z.). J. Nat. Cancer Inst., 1958, 20, 875.
- [9] BRIODY (B. A.), HAUSCHKA (T. S.) et MIRAND (E. A.). Am. J. Hyg., 1956, 63, 59.
- [10] Briody (B. A.). Proc. Anim. Case Panel, 1955, 6, 1.
- [11] DOWNIE (A. W.) et Mc GAUGHEY (C. A.). J. Path. Bact., 1935, 40, 47.
- [12] NAUCK (E.). Arch. exp. Zellfschg, 1936, 18, 336.
- [13] KATO (S.), HAGIWARA (K.) et KAMAHORA (J.). Med. J. Osaka Univ., 1955, 6, 39.
- [14] Cabasso (V. J.), Brown (R. G.) et Cox (H. R.). Proc. Soc. exp. Biol., 1957, 95, 471.
- [15] Enders (J. F.) et Peebles (Th. C.). Proc. Soc. exp. Biol., 1954, 86, 277.
- [16] Weller (Th. H.). Proc. Soc. exp. Biol., 1955, 83, 340.
- [17] Barski (B.), Lamy (M.) et Lépine (P.). Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, 415.

## LA RÉACTIVATION MULTIPLE DU BACTÉRIOPHAGE INACTIVÉ PAR VOIE PHYSIQUE ET CHIMIQUE

QUATRIÈME PARTIE

par W. MUTSAARS (\*).

(Université Libre de Bruxelles, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Laboratoire de Bactériologie)

## I. — ÉTUDE DU PHAGE GLYOXALÉ

Underwood et Weed [1] ont étudié l'action du glyoxal et de composés voisins tels que le kethoxal (β-éthoxy et α-kétobutvraldéhyde) sur divers virus : grippe, Newcastle et hépatite de la souris. Ces corps ont une action virulicide plus puissante que celle de la β-propiolactone. Mc Limans, Underwood, Slater, Davis et Siem [2] exécutent la plupart de leurs recherches avec le kethoxal, qui semble agir par effet virulicide direct sur les éléments extracellulaires. Ils observent une action nette sur les virus de la grippe, des oreillons ainsi que sur le virus vaccinal et celui de Newcastle. De Bock, Brug et Walop [3] observent également que le virus grippal perd son pouvoir infectieux sous l'action des glyoxals, ceux-ci détruisant à dose plus élevée l'activité enzymatique du virus. Tiffany et coll. [4] ont étudié l'effet de 95 composés (glyoxals aliphatiques, et hydroxyaldéhydes) sur les virus de la grippe et de Newcastle. Ces essais ont été poursuivis par Moffett et coll. [5] au moven de glyoxals aromatiques, tandis que Wright, Lincoln et Heinzeman [6] ont observé que de nombreux dérivés de la β-aminolactaldéhyde étaient actifs.

André Thomas et Hannoun [7] notent que l'action virulicide du glyoxal sur le virus grippal in vitro est dix fois plus grande que celle du formol; de plus, le glyoxal inhibe la multiplication du virus dans l'embryon de poulet, le virus étant toutefois moins sensible au cours de sa phase intracellulaire.

L'étude de Staehelin [8] a porté sur l'action de la formaldéhyde, du glyoxal et du kethoxal sur la mosaïque du tabac. Cet auteur a

<sup>(\*)</sup> Manuscrit reçu le 3 août 1959.

observé qu'il faut des concentrations plus élevées pour détruire le virus entier, l'acide ribonucléique isolé étant plus sensible. La formaldéhyde et les glyoxals inactiveraient le virus par combinaison avec l'acide nucléique.

André Thomas, Barbu et Cocioba [9] ont montré que le glyoxal a une action destructrice sur divers bactériophages, mais que, contrairement à ce qui se passe pour la grippe, le formol est

deux fois plus actif que le glyoxal (voir aussi [10]).

Ces essais nous ont incité à rechercher si le bactériophage partiellement inactivé par le glyoxal, une dialdéhyde, donnait lieu au phénomène de réactivation multiple déjà observé avec le bactério-

phage partiellement inactivé par le formol [11].

Le glyoxal utilisé se présente sous forme d'une solution aqueuse à 30 p. 100 (Light and C°). Après quelques essais, nous avons procédé à l'inactivation du bactériophage  $\varphi$  N en mettant celui-ci au contact d'une solution de glyoxal à 0,3 p. 100, obtenue en ajoutant à 4,5 ml de phage non dilué 0,5 ml d'une dilution à  $10^{-1}$  de la solution commerciale. Ce mélange est maintenu en tube scellé dans un bain-marie à 38° pendant une heure.

## Expérience I.

## Réactivation multiple homologue.

Le phage, partiellement inactivé par le glyoxal, est dilué à  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ .

On établit les mélanges suivants :

A:4ml de phage inactivé dilué à  $10^{-1}+4$ ml de culture de coli W âgée de 5 heures.

B: 4 ml de phage inactivé dilué à 10-2 + 4 ml de culture de

coli W âgée de 5 heures.

Après séjour de cinq minutes au bain-marie, ces mélanges sont titrés par la méthode de Gratia, en quintuple exemplaire. Le mélange B est titré tel quel, cependant que l'on dilue le mélange A à 10<sup>-1</sup>, avant le titrage (expériences 1 à 7) ou à 10<sup>-2</sup> (expériences 8 à 10).

Il est fait un titrage du phage  $\varphi$  N non traité par le glyoxal et une numération de la culture de coli, ce qui nous permet d'établir le quotient particules/germes en présence. Les résultats de dix

essais sont exposés au tableau I.

Il faudrait s'attendre, si ces expériences étaient faites avec du phage intact, à trouver un nombre régulièrement inférieur de plages dans les résultats des séries A par rapport à ceux des séries B. Le quotient particules de phage/germes dépassant largement l'unité dans les séries A, les infections multiples par particules intactes seraient nombreuses. On n'obtiendrait donc pas, après dilution à  $10^{-1}$  (ou  $10^{-2}$ ) de ces mélanges, un nombre de plages équivalent

TABLEAU I.

		Α.			В.					
Exp.	Moyenne Arithm. de 5 boites.	Ecart Type.	Quot. Phage / Germe.	Moyenne Arithm. de 5 boites.	Ecart Type.	Quot. Titres A / B.	Rapport de Variance F.			
1	580	100	5,7	14,4	4,47	40	124			
2	1380	118	6,3	12	3,7	115	536			
3	2888	312	12,2	55,6	6,7	52	328			
4	247	23,7	6,4	12,8	3,1	19	385			
5	185	33,6	8,2	2,4	1,4	77	110			
ó	5490	410	4,8	65,6	10,7	83	697			
7	2360	197	2,7	53,6	2,4	44	547			
8	1256	68,9	7	139	10,8	92	1027			
9	2254	74,84	7,6	132	13	170	3902			
10	2952	163	7,6	446	35,66	130	1286			

RAPPORTS DE VARIANCE F. — Les chiffres > 5,52 sont significatifs à 5 p. 100, > 11,26 sont significatifs à 1 p. 100, > 25,42 sont significatis à 0, 1 p. 100 pour  $n^1 = 1$  degré de liberté,  $n^2 = 8$  degrés de liberté. Ces remarques s'appliquent aux tableaux I, IV et V.

à celui que l'on observerait dans les séries B, où les infections multiples seraient comparativement fort rares.

Le résultat inverse observé est dû à l'utilisation de phage partiellement inactivé. Sous l'action du glyoxal, il ne reste environ qu'une particule viable sur un million, les infections multiples possibles dans les mélanges de type A seront presque toutes formées de deux ou plusieurs particules isolément inactives. L'excès de plages observé dans les séries A est l'expression de la réactivation mutuelle de ces particules.

Les titres obtenus par la technique A sont de dix-neuf à cent trente fois supérieurs à ceux observés en utilisant la technique B.

#### Expérience II.

Réactivation multiple hétérologue entre particules de phage inactivées par le glyoxal et par les rayons ultra-violets.

On dispose de phage irradié par une lampe Westinghouse Sterilamp type W L 15 (pour la technique voir [11]). Ce phage est dilué à 10<sup>-1</sup>. Le phage inactivé par le glyoxal est dilué à 10<sup>-2</sup>.

On prépare les mélanges suivants :

A: 2 ml de phage irradié + 2 ml de bouillon; B: 2 ml de phage glyoxalé + 2 ml de bouillon;

C: 2 ml de phage irradié + 2 ml de phage glyoxalé.

A chacun de ces mélanges placés au bain-marie à 38°, on ajoute 4 ml d'une culture jeune de coli W; le titrage se fait après contact de cinq minutes. Il est fait en outre une numération du coli W et un titrage du phage non traité. Le quotient particules de phage/germes en présence que l'on en tire a été calculé pour le phage irradié. Pour le phage glyoxalé, utilisé à la dilution 10-2, les quotients seront naturellement dix fois inférieurs. Le nombre de plages obtenu par titrage des mélanges C est de trois à dix fois supérieur à celui fourni par les titrages des mélanges A et B additionnés.

TABLEAU II.

Exp.	A Phage irradié + bouillon.	Ecart type de A.	B Phage glyoxalé + bouillon.	Ecart type de B.	C Phage irradié + Phage glyoxalé.	Ecart type de C.	Quotient Phage/Germe en présence (cal- culé pour les mólanges Phage irradié + bouillon.	réacti- vation C A+B
1.	17,2	4,1	26,2	7,2	141,6	35,4	6,1	3,26
2,	3,8	0,75	16,2	7,3	219,6	19,2	2,6	10,9
3.	2	1,4	24,8	7,1	247,4	49	1,3	9,2
4.	13,8	1,6	10,6	0,9	222,8	23,7	1	9,1

## Expérience III.

Effets thermiques sur le rendement du phage glyoxalé.

Il résulte d'essais antérieurs [12] que le rendement en plages des mélanges de germes et de phage formolé, constitués de façon à exclure l'infection multiple, est plus élevé si le contact entre germes et particules s'effectue à 0° au lieu de 38°. Ce rendement s'améliore encore si les boîtes de Petri constituant le titrage séjournent ensuite à 42° pendant une heure et demie. Nous avons répété ces essais en utilisant du phage glyoxalé.

Constituons deux mélanges identiques, contenant 6 ml de culture jeune de coli W et 6 ml d'une dilution à 10-2 de phage traité par le glyoxal. Un de ces mélanges (0°) est maintenu pendant dix minutes dans un bain de glace fondante, les deux composants avant d'ailleurs été préalablement refroidis. Séparément, dans les mêmes conditions, l'autre mélange (38°) est maintenu à 38° au bain-marie.

TABLEAU III.

	l H	1 0	1			
Test de Duncan et rapport de variance F	III > (I, II), NS IV IV > (I, II) $_{\mathbf{F}} = 38,21$	IV > (I,II,III) III > (I,II,) II > I   > 108,2	IV > (I, III, II) II > I, NS III III > I	IV > (I,III,II) II > (I,III) III > I	IV 7 (1, II, III) III 7 I, NS II II 7 I F = 82,9	II > (III, I, IV) IV > (III, I) I NS III F = 378
Quotient Phage/ Germe	82.0	96,0	60,0	60'0	0,14	70,0
Ecart Type de IV	12	13	37	9,61	8	150
38/42	280	175,8	272,8	185	201,8	7413
Ecart Type de III	71	23,2	8,6	ω	18	43,5
111 38/38	312	138,8	146,2	4,46	102,8	365
Ecart Type de II	2,9	5,6	51	61	45	300
II 0/42	142	8,16	175,8	130,6	92,8	3805
Ecart Type de I	3,2	8,8	3,8	2,4	4,6	151
I 0/38	59	μ°6Ι	9,09	19,2	55	555
Exp.	1	CI .	ĸ	#	2	5 bis

pas de la moyenne suivante de façon significative. Les calculs ont été établis pour le niveau de sécurité de 1 p. 100. Pour le rapport de variance F: des chiffres > 3.24 sont significatifs à 5 p. 100, des chiffres > 5.25 sont significatifs à 1 p. 100, Ceci pour  $n^1 = 3$  degrés de liberté et  $n^3 = 16$  degrés de liberté. cativement des moyennes suivantes mises entre parenthèses, les NS indiquent que cette même moyenne précédente ne diffère Test de Duncin. — Le signe > précédé d'un chiffre romain indique que la moyenne de la série en question diffère signifi-Ces remarques concernent les tableaux III et VI. Le titrage de chacun de ces mélanges se fait sur dix boîtes de Petri, dont cinq sont aussitôt portées à l'étuve à 38°; les cinq autres séjournent préalablement pendant une heure et demie dans une étuve à 42° avant d'être mises à l'étuve à 38°.

De ces opérations résultent quatre séries de cinq boîtes, à savoir : une série 0°/38° (I), une 0°/42° (II), une série 38°/38° (III) et une

série 38°/42° (IV).

Il est fait en même temps un titrage du phage non traité et une numération de la culture microbienne, ce qui permet de calculer le quotient phage/germes en présence. Ce quotient est toujours nettement inférieur à l'unité, les chances d'infection multiple sont donc minimes.

Le tableau III donne les résultats de cinq expériences de ce type. L'expérience 5 bis est un essai fait dans les mêmes conditions, avec le même stock de phage, mais en substituant du phage formolé et dilué à 10<sup>-3</sup> au phage glyoxalé.

Cette dernière expérience confirme les essais antérieurs [12].

Le comportement du phage glyoxalé est en partie différent de celui du phage formolé. Si le séjour des boîtes de Petri à 42° est toujours favorable, le rendement en plages est au contraire diminué par le contact entre germes et particules en milieu liquide à 0°.

Les écarts maxima s'observent en général entre les séries 38°/42° (IV) et 0°/38° (I). Le test de Duncan [13] ou « R test » permet de s'assurer que les différences entre les divers résultats sont ou non

significatives.

Selon Staehelin [8], le glyoxal et le kethoxal réagiraient avec la fonction imino en position 1 de l'anneau guanine (la 1 méthylguanine par exemple ne réagissant pas). Le spectre ultra-violet de l'acide guanilique traité par le glyoxal ou le kéthoxal est modifié de façon marquée, mais pas celui des acides adényliques et cytidyliques. Fraenkel-Conrat [14] a constaté des modifications des spectres d'absorption en ultra-violet de l'adénine, adénosine, acide guanylique et acide cytidylique traités par le formol. Dans les mêmes conditions la thymine et l'acide uridylique ne se modifient pas. Des virus à acide ribonucléique : mosaïque du tabac, virus du bushy stunt de la tomate, traités par le formol, ont un spectre modifié, ce qui n'est pas le cas pour des virus à acide désoxyribonucléique tels que le phage T2 et celui d'un papillome.

D'autre part Zamenhof, Alexander et Leidy [15, 16], en faisant agir du formol à concentration à vrai dire élevée (4 M) sur le principe transformateur (acide désoxyribonucléique) de *H. influenzae*, ont observé une diminution de la viscosité et une inactivation de leurs solutions. Le formol à 0,35 M ne paraît avoir aucune action.

André Thomas et ses collaborateurs ont constaté que ni le formol ni le glyoxal ne modifient le spectre d'absorption de l'acide désoxyribonucléique du thymus, ni celui d'un bactériophage [10];

dans les mêmes conditions, il y a modification du spectre de l'acide

ribonucléique de la levure.

Il paraît donc établi que le formol et le glyoxal réagissent avec l'acide ribonucléique, et que le site de la réaction varie sclon l'aldéhyde. Ces mêmes aldéhydes ne paraissent pas réagir avec l'acide désoxyribonucléique (sauf pour le formol à dose très élevée). Si l'on admet que leur effet inactivant sur le phage est dù à leur action sur les groupements aminés des protides, il faut conclure de ces expériences de réactivation que cet effet s'exerce en profondeur, sur des protides liés à l'acide nucléique. L'atteinte des protides de la membrane du phage ou du mécanisme fixateur de celui-ci ne joue, dans les conditions où nous nous sommes placé, aucun rôle majeur dans l'inactivation, puisque la pénétration de matériel inactivé peut s'opérer.

D'autre part, les résultats opposés d'un même traitement thermique infligé au phage formolé ou glyoxalé sont vraisemblablement le reflet de différences qualitatives des sites attaqués (1).

## II. — ÉTUDE DU PHAGE DÉAMINÉ

Zamenhof [45] a utilisé un procédé relativement bénin pour déaminer le principe transformateur de H. influenzæ. Nous avons appliqué cette réaction à la déamination du phage  $_{\phi}$  N. Une solution tampon est préparée contenant 8,85 ml d'acide citrique à 1 M et 11,15 ml de phosphate disodique à 2 M. Nous ajoutons 0,5 ml de ce mélange à 4,5 ml de phage  $_{\phi}$  N, ce qui abaisse le pH à 5,5, et introduisons finalement 0,4 ml d'une solution de nitrite de soude à 8,7 M. Le tube est scellé et conservé au bain-marie à 38° pendant une heure.

#### Expérience IV.

Réactivation homologue du phage déaminé.

Le phage déaminé est dilué à 10<sup>-1</sup>. Nous préparons les mélanges suivants :

A : 4 ml de phage déaminé dilué à  $10^{-1}$  + 4 ml d'une culture jeune de coli W diluée à  $10^{-2}$ .

(1) Des essais plus récents, tant au moyen de phage formolé que de phage glyoxalé, ont montré que des mélanges en milieu liquide de phage partiellement inactivé et de germes soumis pendant cinq minutes à des températures de 38° à 50° (les boîtes de Petri résultant des titrages séjournant ensuite dans une étuve à 38°), ont un rendement en plages qui augmente avec la température pour atteindre un maximum se situant d'habitude à 48°. A cette température et pour le phage formolé, le nombre de plages de bactériophage est de dix à quatre-vingts fois plus élevé qu'à 38°.

Cette question sera traitée dans une prochaine publication.

B: 4 ml de phage déaminé dilué à  $10^{-1} + 4$  ml d'une culture jeune de coli W diluée à  $10^{-1}$ .

Il est fait en même temps une numération de la culture de coli W et un titrage du phage  $\phi$  N non traité, à partir d'un mélange de 4,5 ml de phage et de 0,9 ml de bouillon. Ceci nous donne le quotient particules de phage/germes en présence.

Les mélanges de phage et de germes sont titrés après contact

de dix minutes au bain-marie à 38°.

TABLEAU IV.

			Α.		В.					
Exp.	Moyenne Arithm. de 5 boites.	Ecart Type.	Quotient A/B.	Quotient Phage / Germe.	Moyenne Arithm. de 5 boites.	Ecart Type.	Quotient Phage / Germe.	Rapport de Variance F.		
1,	63,8	15,6	1,37	21	46,4	4,33	2,1	5,74		
2	70,8	8,87	1,40	18	47,6	2,88	1,8	30,9		
3	34,8	6,45	2,41	13	14,4	2,3	0,13	44,3		
21	76,4	11,6	1,27	30	60	10	0,3	5,7		
5	156	14,2	1,62	56	96,4	19,8	0,56	29,9		
6	22,8	6	1,87	21,5	12,2	5	0,2	à		
7	1734	207	1,59	43	1091	94,5	0,4	39,8		
8	439	67,7	1,30	70	336	39,5	0,~	9,6		
9	1392	197	1,52	83	914	<sup>11</sup> 5,7	0,~	28,3		
10	446	71	1,25	86	356	49	0,9	6,3		

Le tableau IV résume les résultats de dix essais. La réactivation multiple obtenue au moyen de phage déaminé est significative, car le rapport de variance F atteint ou dépasse le niveau de probabilité de 5 p. 100 dans toutes les expériences. Il n'en demeure pas moins que cette réactivation est loin d'égaler les proportions obtenues au moyen du phage formolé ou glyoxalé. Pour six expériences faites avec du phage formolé, le rapport F est de 34, 16, 180, 55, 20 et 57; c'est-à-dire que le niveau de probabilité de 1 p. 100 est partout atteint et largement dépassé.

## Expérience V.

Réactivation hétérologue du phage déaminé par le phage inactivé par les rayons ultra-violets.

Trois mélanges sont utilisés pour ces essais :

A : 4 ml de phage déaminé dilué à 2.  $10^{-2} + 4$  ml d'une culture jeune de coli W diluée à  $10^{-1}$ .

B: 4 ml de phage irradié dilué à  $10^{-1} + 4$  ml d'une culture

jeune de coli W diluée à 10-1.

C: 2 ml de phage déaminé dilué à  $2.10^{-2} + 2$  ml de phage irradié dilué à  $10^{-1} + 4$  ml de culture jeune de coli W diluée à  $10^{-1}$ .

Ces mélanges séjournent pendant dix minutes au bain-marie

à 38°, après quoi on procède au titrage du mélange C.

Un mélange D est constitué à ce moment au moyen de parts égales des mélanges A et B : ce mélange est titré. Les mélanges C et D ne diffèrent que par un seul point : dans le cas du mélange C, au cours du contact de dix minutes en milieu liquide, des infections multiples mixtes ont pu se produire, comportant l'intervention de particules déaminées d'une part, de particules irradiées d'autre part. Dans le cas du mélange D ce processus a eu moins de chances de se réaliser. Les résultats de dix essais sont indiqués au tableau V.

TABLEAU V.

ANDEDING TT								
Exp.	Mélange D	Ecart Type.	Mélange C.	Ecart Type.	Rapport de Variance F.			
1	82,8	8,5	109	8,5	23,5			
2	17	1	24,4	11,2	2,12			
3	873	31,3	1075	50	50,9			
4	982	142	1237	77	12,3			
5	324	33	493	18,5	93,6			
€,	271	15,4	295	16,2	5,9			
7	391	19,9	508	11,6	93.3			
8	250	60	347	33,6	9,6			
9	702	24	798	63	10,6			
10	484	5½,2	591	14,8	19,1			

TABLEAU VI

Test de DUNCAN et Rapport de Variance F.	11> ( 111, 1V, 1 ) 1 > ( 111, 1V )	II> ( III, I, IV ) IV> ( III ); NS I	I NS III F = 14,6.  II > ( III , I , IV )  IV > ( III ); NS I	I NS III F = 16,24.  II> (III, I, IV)  IV> (III) NS T	I > ( III ) F = 80,18.  II > ( III, I, IV )  IV > ( III ); NS I	I NS III F = 57,8  II>( III, I, IV ) IV>( III, I I ) F = 1/3 O
Quotient Phage Germe.	0,02	0,05	0,03	0,05	90,0	60,03
IV. Ecart 38 / 42. Type de	214	30,5	58,4	6,78	25,4	16,7
IV.	2375	73,6	162,4	9,49	124,4	117,2
III. Ecart 38 / 38. Type de III.	62	6,5	3,28	3,6	6,3	5,19
111. 38 / 38.	1900	23,6	84,2	30,4	51,8	41,6
Ecart Type de II.	320	54,7	76,3	33,5	55,6	8*94
II. 0 / 42.	4535	134,2	286,2	8,161	290,2	216,8
Ecart Type de I.	284,5	17,7	21,5	2	6,16	30
1. 0 / 38.	3150	9"71	115	61,6	4,68	77,4
Exp.	1	α	2	7	10	9

Le nombre de plages donné par les mélanges C est plus élevé que celui fourni par les mélanges D, le rapport des variances dépasse le niveau de probabilité de 5 p. 100 (sauf pour l'expérience 2).

Il existe donc une réactivation hétérologue significative, mais elle est notablement plus faible que celles des combinaisons hétérologues précédentes.

## Expérience VI.

Effets thermiques sur le rendement du phage déaminé.

A part le mode d'inactivation, ces essais sont identiques à ceux décrits sous la rubrique Expérience III. Le quotient phages/germes est maintenu à un niveau bas, afin d'éliminer toute possibilité de réactivation multiple. Les résultats de six essais sont exposés au tableau VI. Il en découle que les effets thermiques sur le rendement en plages du phage déaminé correspondent en tous points avec ceux que donne le phage formolé. Le contact en milieu liquide à 0° augmente le rendement, le séjour des boîtes de Petri à 42° est également favorable ; la combinaison des deux traitements assure un rendement optimum.

## CONCLUSIONS

- 1º La réactivation multiple homologue s'obtient avec du bactériophage partiellement inactivé par le glyoxal et, à un degré moindre, avec du bactériophage partiellement inactivé par déamination.
- 2º Il est possible d'obtenir une réactivation multiple hétérologue entre, d'une part, du bactériophage partiellement inactivé par les radiations ultra-violettes et, d'autre part, du bactériophage partiellement inactivé par le glyoxal ou par déamination.
- 3° Dans des conditions excluant la multiplicité d'infection, le phage partiellement inactivé par le glyoxal donne un rendement en plages plus élevé si le contact entre particules et germes s'effectue à 38° et si les boîtes de Petri du titrage séjournent ensuite à 42°. Ceci est en opposition avec ce qui se passe pour le phage formolé, où le meilleur rendement s'obtient par un contact entre les particules et les germes à une température voisine de 0°, suivi de séjour à 42° des boîtes de Petri. Le comportement du phage déaminé est identique à celui du phage formolé.

## SUMMARY

# MULTIPLICITY REACTIVATION OF BACTERIOPHAGE INACTIVATED BY PHYSICAL AND CHEMICAL AGENTS.

1. Mutual reactivation occurs in multiple infections with glyoxalinactivated coliphage and, to a lesser degree, with coliphage inactivated by deamination.

2. Phage inactivated by glyoxal or by deamination is reactivated

by phage inactivated by ultra-violet irradiation.

3. The number of plaques resulting from mixtures of bacterial cells and the corresponding phage partially inactivated by glyoxal, in ratios ensuring single infections, is influenced by the temperature. The best results are obtained by keeping the mixtures at 38°, the agar plates resulting from the titration being kept at 42° for 1.1/2 hour before incubation at the usual temperature of 38°. With phage inactivated by formaldehyde, on the contrary, the best combination is: 0° during the fixation of the phage, followed by the 42° treatment. In this instance phage inactivated by deamination reacts like formaldehyde inactivated phage.

#### BIBLIOGRAPHIE

[1] Underwood et Weed. Proc. Soc. exp. Biol., 1956, 93, 421.

[2] Mac Limans, Underwood, Slater, Davis et Siem. J. Immunol. 1957, 78, 104.

[3] DE BOCK, BRUG et WALOP. Nature, 1957, 179, 706.

- [4] TIFFANY, WRIGHT, MOFFETT, HEINZELMAN, STRUBE, ASPERGREN, LINCOLN et WRIGHT. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 1682.
- [5] Moffett, Tiffany, Aspergren et Heinzelman. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 1687.
- [6] Wright, Lincoln et Heinzelman. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 1690.
- [7] THOMAS (J.-André) et HANNOUN (Cl.). C. R. Acad. Sci., 1957, 244, 2258.

[8] STAEHELIN (M.). Bioch. Biophys. Acta. 1959, 31, 448.

- [9] THOMAS (J.-André), BARBU et COCIOBA. C. R. Acad. Sci., 1957, 245, 1182.
- [10] Thomas (J.-André). The biological replication of macromolecules, Cambridge University Press, 1958, 242.
- [41] MUTSAARS. Ann. Inst. Pasteur, 1957, 92, 1.[42] MUTSAARS. Ann. Inst. Pasteur, 1959, 96, 93.
- [13] Weber. Grundriss der biologischen Statistik, 3° édition, p. 220, Gustav Fischer, édit., Iéna, 1957.

[14] Fraenkel-Conrat. Bioch. Biophys. Acta, 1954, 15, 307.

[15] ZAMENHOF, ALEXANDER et LEIDY. J. exp. Med, 1953, 98, 373.

[16] ZAMENHOF. The chemical basis of heredity, p. 269, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957.

## CULTURE DE BORRELIA RECURRENTIS (SOUCHES ÉTHIOPIENNES) EN ŒUF FÉCONDÉ DE POULE

par Ruth J. REISS-GUTFREUND (\*).

(Institut Pasteur d'Ethiopie)

De nombreux auteurs parmi lesquels Chabaud [2], Oag [6], Rodhain et van den Bergh [7], Hallauer et Kühn [4], Levaditi et

coll. [5], etc., ont cultivé Borrelia duttoni dans l'œuf.

Par contre, et sans doute à cause du nombre limité des foyers de récurrente classique, il n'y a guère que Chen, et Balozet en Afrique du Nord, qui ont expérimenté ce moyen de culture pour B. recurrentis.

Sachant par les travaux de Wolman [11] et de Sparrow [8, 9, 10] que les souches éthiopiennes de B. recurrentis présentent des caractères classiques, et bénéficiant sur place d'un matériel abondant, il nous a paru intéressant de suivre leur comportement dans l'œuf fécondé de poule.

A la suite de premières manipulations commencées avec Sparrow [10] et poursuivies de notre côté, il nous était en effet permis d'espérer trouver dans cette technique un procédé simple et économique pour isoler et conserver un germe considéré de manipula-

tion délicate.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

- 1º ISOLEMENT DES SOUCHES. Les souches de Borrelia recurrentis ont été isolées :
- a) Directement, du sang des malades au cours d'accès dont la spécificité était vérifiée sur goutte épaisse : des fragments de caillot, gros comme un petit pois, sont déposés sur la membrane chorio-allantoïdienne (m. c. a.) d'œufs de poule fécondés, incubés à 39° pendant douze ou treize jours.

Chaque expérience comporte l'ensemencement de 6 ou 7 œufs.

- b) Parallèlement, sept ou huit jours plus tard, du liquide cœlomique de poux d'élevage nourris trente minutes, sur les bras de patients au cours de ces mêmes accès : après avoir été trempés quelques secondes
  - (\*) Société Française de Microbiologie, séance du 2 juillet 1959.

dans de l'alcool dénaturé, 15 à 20 poux sont ponctionnés. Leur liquide cœlomique est récolté dans un verre de montre contenant environ 0,5 cm³ d'un mélange comportant 9 parties de liquide de Ringer et 1 partie de sang total humain.

Ce matériel, qui permet d'ensemencer 6 ou 7 œufs préparés comme précédemment, est déposé à la dose de 2 gouttes sur les m.c. a de chacun des œufs.

2º Passaces. — L'embryon et ses membranes sont recueillis dans une boîte de Petri. Le sang de l'embryon et le liquide amniotique étant mélangés, il se produit une coagulation partielle.

Un fond noir et un Giemsa permettent d'évaluer la richesse en B. recurrentis du matériel liquide et du caillot.

La fraction liquide telle quelle, ou encore mélangée à différents diluants et à la dose de 2 gouttes, sert à inoculer les œufs, soit par injection intravitelline, soit par dépôt sur la m. c. a., soit par dépôt sur la membrane coquillière.

Le caillot est dilacéré en fragments du volume d'un petit pois. Ces fragments sont déposés sur la m. c. a. des œufs.

Chaque passage comporte autant de lots de 7 œufs incubés à 39° qu'il y a de variétés d'inoculats et de modes d'inoculation.

3º CONTRÔLE DE VIRULENCE. — Tout matériel provenant de sang de malades, d'isolements sur œufs ou de passages d'œuf à œuf est systématiquement inoculé à des poux d'élevage, selon la technique de Weigl.

Un autre contrôle de la virulence a consisté, après avoir injecté du sang embryonnaire à des poussins de 24 heures (1/20 de centimètre cube par voie sous-cutanée dans la cuisse) et à des lapereaux âgés de 2 ou 3 jours (0,3 cm³ par voie intrapéritonéale), à rechercher de vingt-quatre heures en vingt-quatre heures l'apparition d'hémoparasites chez les animaux.

- 4º Souches. Cinq souches ont été isolées à la fois du sang de malades et de poux nourris sur eux.
- a) Souche W. Provenant d'un malade présentant des B. recurrentis incomptables par champ et de 60 poux, qui, après avoir été nourris sur lui, présentaient au huitième jour une infection massive de leur liquide cœlomique.

Souche passée trente-cinq fois sur œuf.

b) Souche WD. D'un malade porteur de 1 ou 2 parasites par champ et de 70 poux nourris sur lui.

Souche passée trente et une fois.

- c) Souche MA. D'un malade présentant 30 B. recurrentis par champ et de 50 poux infestés sur lui.

  Souche passée huit fois.
- d) Souche GD. Isolée seulement d'un malade présentant 1 B. recurrentis tous les 10 champs.

Souche passée sept fois.

e) Souche HS. D'un malade présentant 1 B. recurrentis par champ à la goutte épaisse ainsi que de poux nourris sur lui. Souche passée cinq fois.

Les souches MA, GD, HS n'ont été isolées que pour nous assurer de la facilité avec laquelle il est possible d'obtenir des B. recurrentis, soit de poux sur l'œuf, soit de sang dans l'œuf.

Nous n'avions aucune raison de poursuivre les passages.

### Résultats

1º Ensemencements. — Les inoculations par dépôt sur la m. c. a. et par injection intravitelline ont donné des réponses superposables. Celles par dépôt sur la membrane coquillière restent négatives

lorsque cette membrane n'est pas lésée au cours des manipulations. Ce fait a été vérifié sur 50 œufs manipulés avec soin : aucun hémo-

parasite n'a traversé la membrane intacte.

2° Action des dilluants. — Ajoutés en parties égales au mélange sang embryonnaire et liquide allantoïdien, les diluants tels que l'eau saline à 8,5 p. 100, l'eau saline citratée à 2 p. 100, l'eau distillée, ne font pas varier le pouvoir infestant.

3º Délais d'apparition des « B. recurrentis ». Richesse des passages. — Il arrive parfois qu'au cours d'inoculations identiques certains œufs au même stade et provenant d'un même lot restent réfractaires, alors que les autres s'infectent massivement. Peut-être dans ces rares cas, pourrait-on incriminer la qualité des œufs manipulés.

En règle générale, la vitesse avec laquelle les B. recurrentis des souches éthiopiennes apparaissent dans l'œuf ne dépend ni de leur nombre lors de l'inoculation, ni du numéro du passage dont ils

proviennent.

Contrairement aux souches nord-africaines, les cultures passent aisément d'œuf à œuf et restent aussi luxuriantes au trente-

cinquième qu'aux premiers passages.

Nous devons, ici, insister sur une observation que nous avons vérifiée chaque fois : la multiplication des hémoparasites s'avère d'autant plus rapide, et donc les délais de leur apparition d'autant plus brefs, que l'incubation des œufs lors de l'inoculation a été plus longue :

Quatorze lots d'œuss sécondés incubés du septième au vingtième jour, sont inoculés par le même procédé avec un matériel identique.

Chaque jour, 2 œufs sont prélevés et les B. recurrentis recher-

chés au fond noir et au Giemsa.

On s'aperçoit, par exemple, que pour des œufs incubés depuis sept jours, les premiers parasites apparaissent au septième jour, alors qu'ils se voient dès le troisième jour dans les œufs incubés depuis dix-huit jours et en quarante-huit heures dans des œufs

du dix-neuvième jour.

Ce délai de deux jours semble être le temps minimum pour que B. recurrentis apparaisse en culture dans l'œuf de poule. On décèle en effet des hémoparasites dans des œufs à leur éclosion (vingt et unième jour) lorsqu'ils ont été ensemencés au dix-neuvième jour, mais ces mêmes œufs n'en laissent pas voir lorsqu'ils ont été inoculés au vingtième jour.

4° Localisation des « B. recurrentis ». — B. recurrentis se

développe avec prédilection dans le sang embryonnaire.

On le retrouve en nombre limité dans des frottis de foie, rate, poumon, cerveau; les broyats de ces organes infectent les œufs.

N'ayant pas pratiqué d'examens anatomo-pathologiques, il nous est impossible de préciser leur localisation ni leur provenance peut-être purement sanguine.

 $5^{\circ}$  Мокрноlogie, мовілітє́, coloration. — Les B. recurrentis paraissent plus allongés dans l'œuf que dans le liquide cœlomique des poux ; leur spires sont plus lâches.

Leur mobilité semble identique.

Dans les embryons fortement infestés on note de constantes formations en tresse.

Au Giemsa, on ne peut différencier les éléments provenant de l'homme ou des œufs.

- 6° ACTION PATHOGÈNE SUR L'EMBRYON, LE POUSSIN, LE POU, LE
- a) Embryons. a) Les embryons meurent au maximum du pullulement des B. recurrentis, généralement en huit à neuf jours lorsqu'ils sont inoculés au septième jour de l'incubation, et en cinq à six jours lorsqu'inoculés au quatorzième jour.

β) Au-delà du quatorzième jour, la plupart meurent à l'éclosion ;

ils sont bourrés de germes.

Des lots de 12 œufs ont été respectivement inoculés aux quatorzième, quinzième, seizième, dix-septième, dix-huitième, dix-neuvième, vingtième jours de l'incubation et conservés en vue d'observer leur éclosion.

Lot du quatorzième jour : Deux poussins éclosent. Ils portent de nombreux parasites qu'ils conserveront jusqu'à leur mort survenant en quarante-huit heures.

Lot du quinzième jour : Eclosion d'un poussin présentant quelques B. recurrentis. Le sang se stérilise en quarante-huit heures ; le poussin survit.

Lots des seïzième et dix-septième jours : Aucune éclosion.

Lot du dix-huitième jour : Un embryon éclôt. De rares parasites

apparaissent à sa naissance et se retrouvent pendant quatre jours. Il survit.

Lot du dix-neuvième jour : Eclosion de 2 poussins. Le premier présente une infection apparaissant au deuxième jour de l'éclosion et qui va croître jusqu'au sixième jour où il meurt bourré de germes.

Chez le second, apparition de nombreux *B. recurrentis* au quatrième jour de l'éclosion. L'animal meurt, fortement infesté, le septième jour.

Lot du vinglième jour : Tous les œuss éclosent sans présenter

d'infection.

b) *Poussins*. Vingt poussins neufs, au sortir de l'œuf, reçoivent dans la cuisse 1/10 de centimètre cube de culture en injection sous-cutanée.

Un seul particulièrement chétif, présentait des B. recurrentis à la quarante-huitième heure ; il mourait le même jour.

c) Poux. Les cultures sur œuf infectent les poux d'élevage après

de nombreux passages.

Nous n'avons pas jugé utile de poursuivre la recherche du pouvoir infestant au-delà de 18 passages pour la souche W, de 15 passages pour WD et de 6 passages pour GD.

d) Lapereaux. Sparrow a montré [9] que les souches éthiopiennes de B. recurrentis infectent le lapin nouveau-né, lorsqu'elles proviennent de poux broyés et qu'elles lui sont injectées dans le péritoine.

Nous avons repris ces expériences que nous confirmons.

D'autre part, nous avons injecté 0,30 cm³ de liquide embryonnaire parasité dans le péritoine de lapereaux âgés de deux à trois jours et avons constaté:

Souche W: Au neuvième passage 4 lapereaux sur 4 contractent la maladie; au vingt-septième passage 2 lapereaux sur 3 contractent

la maladie.

Souches WD: Au quinzième passage 3 lapereaux sur 3 contractent la maladie; au vingt-cinquième passage 3 lapereaux sur 3 contractent la maladie.

Souche GD: Au cinquième passage 3 lapereaux sur 4 contrac-

tent la maladie.

Ainsi, même après de nombreux passages, les cultures de B. recurrentis en œufs se montrent virulentes pour le lapereau nouveau-né.

#### Résumé

1° Cinq souches éthiopiennes de Borrelia recurrentis ont été isolées sur des œufs fécondés de poule.

Ces souches ont été obtenues directement du sang des malades ou encore par l'intermédiaire de poux d'élevage nourris sur eux.

- 2º L'isolement réussit toujours lorsque l'on procède par dépôt de matériel sur la membrane chorio-allantoïdienne.
- 3° Contrairement aux souches nord-africaines, les souches éthiopiennes passent facilement d'œuf à œuf. Leur luxuriance n'est pas diminuée après au moins 35 passages par voie intravitelline et par voie chorio-allantoïdienne.

Une membrane coquillière intacte est une barrière à l'infection.

- 4° Les délais d'apparition de l'infestation ne sont pas influencés par le nombre des parasites ensemencés ni par le numéro des passages dont ils proviennent.
- 5° L'apparition de la culture en œuf est d'autant plus précoce que l'embryon inoculé est plus âgé.
  - 6° B. recurrentis est pathogène pour l'œuf.
- 7º Des contrôles sur lapereaux de 2 à 3 jours et sur des poux d'élevage montrent que de nombreux passages d'œuf à œuf n'affaiblissent pas le pouvoir infestant des cultures.

En conclusion, la culture sur œuf représente un procédé pratique pour l'isolement et l'entretien de souches de Borrelia recurrentis.

## SUMMARY

Culture of Borrelia recurrentis (ethiopian strain) IN FERTILIZED EGGS.

This culture constitutes a practical technique for isolation and maintenance of Borrelia recurrentis strains.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALOZET (L.). Bull. Soc. Path. exot., 1948, 41, 146-149.
- [2] CHABAUD (A.). Bull. Soc. Path. exot., 1939, 32, 483-485.

[3] CHEN (K.). Proc. Soc. exp. Biol., 1941, 46, 638-639. [4] HALLAUER (C.) et Kühn (H.). Z. Hyg., 1940, 122, 406.

[5] LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et CHAIGNEAU (H.), Ann. Inst. Pasteur. 1951, **80**, 19-20. [**6**] OAG (R. K.). J. Path. Bact., 1940, **51**, 127-136.

[7] RODHAIN (G.) et VAN DEN BERGH (L.). Ann. Soc. Belge Méd. trop., 1943, 23, 141.

[8] Sparrow (H.). C. R. Acad. Sci., 1955, 241, 1636-1639.

[9] Sparrow (H.). Arch. Inst. Pasteur Tunis, 1956, 33, no 2.

[10] Sparrow (H.). Bull. Org. Mondiale de la Santé, 1958, 19, 673-710. [11] WOLMAN (B.) et WOLMAN (M.). Ann. trop. Med., 1945, 39, 82-93.

## SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°)

Séance du 5 novembre 1959.

Présidence de M. Prévot.

## PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine. Ce deuxième volume du traité sur les virus publié par F. M. Burnet et W. M. Stanley (1) précède dans l'ordre logique le volume III déjà paru, dont il a été précédemment rendu compte. Il est consacré à l'étude des virus des plantes et des bactéries considérées essentiellement du point de vue théorique et en fonction de leurs propriétés biochimiques et biophysiques. C'est dire l'intérêt qu'il présente en rassemblant d'une façon ordonnée des notions, les unes classiques, les autres récentes, portant sur des virus qui constituent d'excellents modèles d'étude et à partir desquels ont été déduites une large part des notions actuelles sur la nature des virus.

Dans le premier chapitre, S. G. Wildman étudie les processus de l'infection et de la synthèse virale chez les virus des plantes, surtout dans le cas de la mosaïque du tabac : revue générale complète, voire compacte, où l'abondance des travaux est telle qu'il n'est guère possible d'entrer dans le détail des phénomènes étudiés. Le chapitre suivant, par Roy Markham, sur la biochimie des virus des plantes, apporte non seulement une revue générale très complète, mais une contribution de premier ordre au problème général des virus. Il constituera certainement l'un des principaux attraits du volume. Il est de façon très pertinente suivi et complété par un chapitre de C. A. Knight sur les variations, c'est-à-dire essentiellement les mutations, chez les virus des plantes et la base chimique de leur étude. L. M. Black étudie ensuite le cycle biologique des virus des plantes chez les insectes vecteurs.

A partir du chapitre V on abandonne les virus des plantes pour les bactériophages dont A. Lwoff démontre brillamment qu'ils constituent un modèle quasi idéal d'étude des relations virus-hôte. A. Garen et L. M. Kozloff décrivent les stades initiaux de l'infection par le phage; ce chapitre, très complet, est illustré de belles micrographies électroniques. Le chapitre suivant, traitant de la multiplication intracellulaire des bactériophages, est écrit par G. S. Stent qui en donne une étude très compréhensive et largement documentée analysant minutieusement les différents stades du problème; le fait que sa bibliographie, qui occupe cinq pages, comporte également celle des travaux européens, constitue pour le lecteur occidental une agréable surprise. La géné-

Burnet (F. M.) et Stanley (W. M.). The Viruses. Biochemical, biological and biophysical properties. Volume 2: Plant and Bacterial viruses, Academic Press, New York and London, 1959  $(23 \times 15,5 \text{ cm})$ , 408 p. Prix: \$ 13.00.

tique du bactériophage est envisagée par C. Levinthal d'une façon classique et sans apporter de révélations. Une très belle étude est consacrée à la lysogénie par F. Jacob et E. L. Wollman; la clarté du texte s'allie à celle des schémas de la façon la plus heureuse et ce chapitre sera relu et apprécié même par ceux à qui les travaux de ces auteurs sont familiers. Le dixième et dernier chapitre par F. W. Stahl porte sur la radiohiologie du bactériophage; l'auteur n'y envisage du reste que les travaux les plus récents et se contente de renvoyer pour l'historique de la question à une revue générale par Luria en 1955.

Au total, ce volume apporte une documentation très abondante sur des problèmes devenus fondamentaux dans l'étude théorique des virus. Les sujets traités le sont d'un point de vue général et, dans l'ensemble, de façon actuelle et complète. Il ne faut pas y chercher des notions pratiques, hors du but poursuivi, mais l'étude dans le domaine expérimental des aspects les plus passionnants que les techniques biochimiques et biophysiques ont imprimés au problème des virus.

## COMMUNICATIONS

# RECHERCHE DES FORMES FILTRABLES DE BACTÉRIES DANS LES FRUITS DE MER

#### RETOUR AUX FORMES NORMALES EN MILIEUX ORDINAIRES

par J. BRISOU (avec la collaboration de J. CADEILLAN).

(Ecole de Médecine de Poitiers et Laboratoire vétérinaire départemental)

Le but de cette note est de préciser l'existence de formes filtrables de bactéries dans les eaux de mer et les coquillages et de montrer le retour possible de certaines de ces formes à l'aspect de bactéries normales.

On sait bien entendu qu'il existe des formes L et des Pleuropneumoniales dans les eaux usées et que certaines souches, les souches Laidlaw entre autres, ont été parfaitement étudiées.

Le fait de rencontrer de tels microorganismes dans des coquillages ne peut donc surprendre. L'obtention de formes normales en partant de filtrats, et cela sans aucun artifice de culture, a été moins fréquemment observé.

Technique. — Les coquillages utilisés provenaient de la région ostréicole de Marennes (Charente-Maritime). Les moules (Mytylus edulis) et les huîtres (Gryphea angulata) par lots de 6 et 12 étaient superficiellement nettoyées à l'eau de ville, puis ouvertes et broyées aseptiquement.

Un premier filtrat grossier était effectué sur papier chiffon. Ce filtrat opalescent et trouble était ensuite passé sur filtre Seitz. Enfin une troisième filtration était effectuée sur filtre Iena G5 dont la porosité est inférieure à 1,5  $\mu$ . On obtenait un filtrat parfaitement limpide ou légèrement opalescent, optiquement vide au microscope à contraste de phase.

Ce filtrat était ensemencé sur bouillon ordinaire, bouillon au cœur de bœuf et bouillon au foie, à raison de 1 ml pour 10 ml de milieu de culture. Les tubes étaient incubés à 37°.

Le broyat non filtré était d'autre part ensemencé sur des milieux variés, notamment une gélose gélatine, et un milieu SS pour étude de la flore générale.

Les tubes ensemencés avec le filtrat n'étaient pas conservés si un développement microbien avait lieu dans les premiers jours. Cette éventualité fut extrêmement rare, ce qui prouve l'excellente qualité des filtres Iena utilisés.

Vers le dixième ou quinzième jour, on voyait apparaître, dans les tubes restés parfaitement limpides, un dépôt pulvérulent que l'examen au contraste de phase révélait constitué de corpuscules extrêmement fins, isolés ou réunis en grappes ou petits amas (fig. 1). Les tubes étaient conservés à l'étuve pour observations ultérieures, dont certaines ont duré six mois. De temps à autre, en principe tous les quinze jours, on pratiquait des repiquages en bouillon de cœur de bœuf ou en bouillon saccharosé à 0,3 M en nous inspirant des travaux de Mandel et collaborateurs [4].

L'examen régulier des dépôts effectué au contraste de phase nous a permis de suivre l'enrichissement des tubes en formes globuleuses et en amas de petits granules. Nous avons pu les photographier aisément. Ces granules étaient encore plus facilement observables en présence de traces de bleu de méthylène, introduit sous les lamelles.

Sur un des lots d'huîtres nous avons pu suivre l'apparition de formes bacillaires qui donnèrent au sixième repiquage de magnifiques ondes moirées dans les bouillons. Le microscope révélait la présence de formes bacillaires longues, filamenteuses, mobiles, repiquables en série en milieux liquides seulement (fig. 2). Nous avons pu les habituer aux géloses, en enrichissant petit à petit les bouillons avec des doses croissantes d'agar-agar. Au quinzième repiquage nous avons enfin obtenu une culture absolument normale d'un bacille Gram négatif, mobile, que nous avons pu identifier : il s'agissait d'un Achromobacter beaufortensis, bien connu en microbiologie marine. Les milieux ordinaires et SS n'avaient donné naissance à aucune bactérie de ce type. Le germe existait donc bien dans les filtrats sous sa forme filtrable.

De notre expérimentation nous avons exclu toute substance vivante, tout substrat non stérilisable par la chaleur à 100°, les antibiotiques ou facteurs de croissance accessoires. Toutes les cultures ont été réalisées dans des tubes à ouverture étroite ou en boîtes de Legroux. Ainsi les risques de souillure étaient-ils aussi réduits que possible.

D'un filtrat de moules nous avons obtenu la réversion d'une forme filtrable en un microcoque Gram positif non chromogène, et cela au huitième passage en milieu saccharosé.

D'autres filtrats ont donné des dépôts pulvérulents riches en formes sphériques, avec çà et là quelques images bacilliformes allongées, mais

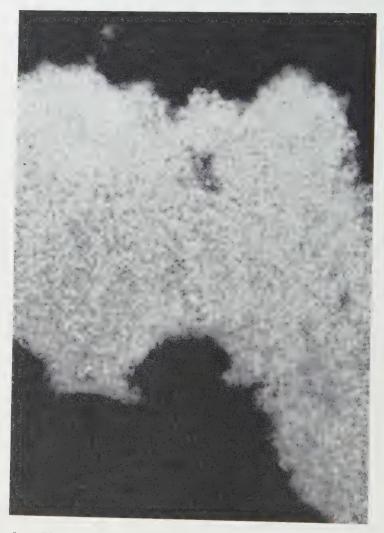


Fig. 1. — Photographie J. Cadeillan, Laboratoire vétérinaire départemental, Poitiers.

nous n'avons pu obtenir de réversion. Sur les géloses molles ces formes donnaient naissance à des microcolonies caractéristiques.

Il apparaît donc, à la suite des recherches systématiques que nous

poursuivons, que les fruits de mer hébergent des bactéries filtrables : ce que bien des auteurs nomment des PPLO, mais que nous estimons plus proches des formes L  $[2,\ 3,\ 4]$ 

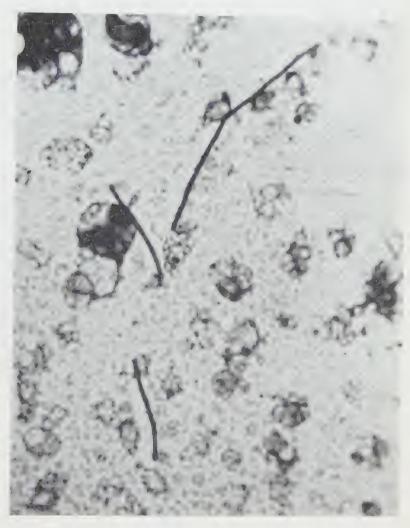


Fig. 2. — Photographie J. Cadeillan, Laboratoire vétérinaire départemental, Poitiers.

Il est probable que certaines d'entre elles évoluent rapidement vers le type 3 B défini par Dienes en 1949, capable de cultiver sur les milieux privés de sérum et de réverser en l'absence de pénicilline. Ces formes ont été étudiées en France par Minck et collaborateurs en 1958 sur la souche de *Proteus* 18 [5]. Les premières colonies que nous obtenions sur gélose correspondaient du reste fort bien aux descriptions maintenant classiques données par ces auteurs. Les formes non réversibles en milieux privés de sérum sont sans doute du type 3 A. Nous en avons observé les microcolonies sur les géloses molles. Des expériences en cours donneront sur ce point des données complémentaires.

La recherche des formes L est poursuivie sur le plan de la microbiologie pure. On peut expliquer dans une certaine mesure la pérennité de certaines espèces, obtenir des notions plus précises sur les cycles microbiens dans la nature. Mais on pense aussi à l'existence possible de bactéries pathogènes dont la réversion serait intéressante à obtenir. C'est là un des objets d'une expérimentation dont on veut exclure le maximum d'artifices. On sait en effet que les liquides organiques, les œufs embryonnés, les cellules de culture mêmes sont fréquemment habités par des formes L et des inclusions variées [6]. Pour éviter toute cause d'erreur, nous nous en tenons donc aux techniques que nous avons précisées. Les conditions sont rigoureuses à l'extrême peut-être, mais les résultatss en sont encourageants, sans bien entendu être inédits.

Conclusion. — Dans les filtrats de coquillages (Gryphea angulata et Mytylus edulis) il est pratiquement toujours possible de mettre en évidence des formes filtrables de bactéries, et cela dans des milieux courants non enrichis de vitamines ou de liquides organiques. Dans certaines circonstances, ces formes filtrables peuvent donner naissance à des bactéries normales parfaitement identifiables. Un Achromobacter beaufortensis et un microcoque Gram positif ont ainsi été obtenus de deux lots de coquillages de la région de Marennes.

Résumé. — L'auteur montre qu'avec des techniques simples, d'où sont exclus les milieux de cultures à base de sérum, de liquides organiques, et privés d'antibiotiques, on peut mettre en évidence des formes L de bactéries dans la majorité des coquillages examinés ; dans certaines conditions on obtient la réversion de formes L vers des formes normales. Les cultures ont donné naissance à un Achromobacter beaufortensis et à un microcoque.

Le point de départ des expériences était des coquillages broyés et soumis à une triple filtration, successivement sur papier, sur filtre

Seitz et sur filtre Iena G5.

# SUMMARY

Examination of shell-fishes for the presence of filterable bacterial forms. Reversion to normal form in normal media.

By means of a simple technique using culture media without serum, organic fluids or antibiotics, it is possible to demonstrate L forms in most of the shell-fishes studied. Under certain conditions, reversion from L forms to normal forms is observed.

The culture also-revealed the presence of an Achromobacter beaufortensis and a Micrococcus.

The original material was constituted by filtrates of ground shell-fishes, submitted to a triple centrifugation through paper, Seitz and Iena G5 filters.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] MANDEL et TULLIO TERRANOVA. C. R. Acad. Sci., 1956, 242, 1082.
- [2] TULASNE (R.) et Brisou (J.). Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, 237.
- [3] MOUSTARDIER (G.) et Brisou (J.). Symposium sur les uréthrites à inclusions, Montréal, septembre 1959.
- [4] Brisou (J.). In Conférences sur la biologie des PPLO, New York Acad. Sci., janvier 1959.
- [5] MINCK, KIRU (A.) et GALLERON (M.). Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 791.
- [6] Ensemble des Conférences sur la biologie des PPLO, New York Acad. Sci., janvier 1959.

# LYSES BACTÉRIOPHAGIQUES ET CROISSANCES SECONDAIRES ALTERNÉES D'UN STAPHYLOCOQUE (SOUCHE Tw)

par M. FAGUET.

(Institut Pasteur, Service des Bactériophages)

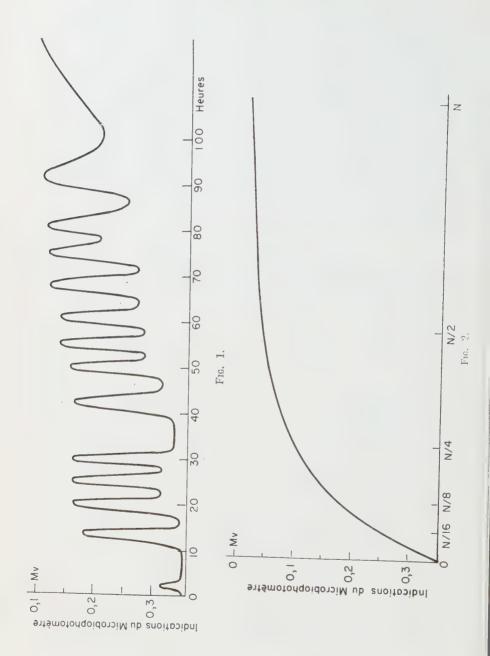
La technique des enregistrements continus des courbes de croissance microbienne par le microbiophotomètre électronique [4] nous donne la possibilité d'enregistrer et d'étudier pendant un temps très long (quelques heures à quelques semaines) la croissance d'un germe en milieu liquide.

Au cours d'un travail dans lequel nous utilisons le staphylocoque blanc Tw provenant d'une souche entretenue depuis de longues années au laboratoire, nous avons remarqué que ce germe donnait en présence du bactériophage Tw une lyse rapide, suivie d'une nouvelle phase de croissance (culture secondaire), puis d'une seconde lyse et ainsi de suite. Un phénomène analogue a déjà été signalé [2], mais la technique des enregistrements continus a pu en préciser les différentes phases.

Enfin, nous avons également recherché si d'autres souches de bactéries d'espèces différentes se comportaient de la même manière.

Technique. — Nous avons utilisé le microbiophotomètre électronique [4]. Chaque série d'expériences comprenait l'étude simultanée de six cultures dans les cuves de l'appareil. Chacune d'elles contenait 20 cm³ de milieu agité au moyen d'un système électromagnétique.

La température était réglée automatiquement à 37° C. La croissance microbienne de chaque culture déterminait l'inscription automatique de courbes



de couleur différente sur un papier quadrillé se déroulant de façon continue à la vitesse de 25 mm à l'heure (1).

MILIEUX DE CULTURE. — Les souches de staphylocoque Tw étaient conservées en peptone gélosée et les milieux liquides étaient constitués d'eau peptonée glucosée à 3 p. 100.

- a) L'eau peptonée utilisée contenait 30 g par litre de peptone Uclaf et 6 g de NaCl. Le pH était ajusté à 7,6 avec de la soude. Le milieu était précipité à l'autoclave à 120°, filtré, puis stérilisé à 115°.
- b) Le milieu solide utilisé pour l'entretien des souches contenait 2,5 p. 100 de gélose.

Bactériophages. — Au cours de ces expériences nous avons utilisé la même suspension de bactériophages préparée en eau peptonée, répartie en ampoules scellées et conservées à  $+4^{\circ}$ . Cette suspension contenait  $1.1 \times 10^{8}$ corpuscules par centimètre cube.

Les phages ont été titrés par la méthode de numération des plages sur gélose peptonée à 1,7 p. 100 après dilutions convenables.

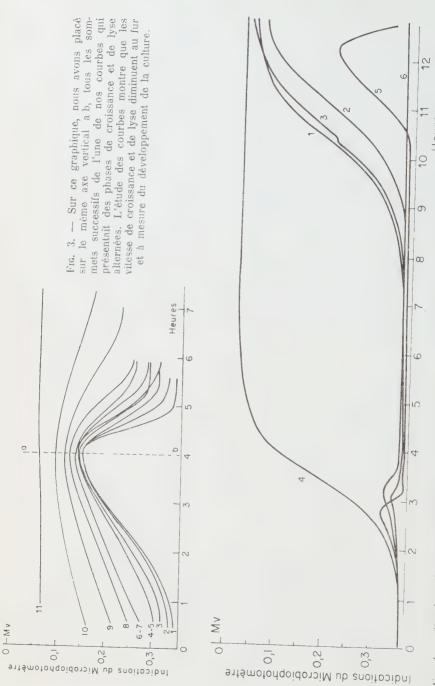
Conditions des expériences. — Nous avons étudié la lyse des cultures de staphylocoque Tw par le bactériophage Tw dans différentes conditions:

- 1° En fonction du moment où le phage a été ajouté à la culture :
- a) En même temps que l'ensemencement ;
- b) Durant la phase exponentielle de la croissance.
- 2º En fonction de la quantité de germes et de bactériophages mis en présence.

RÉSULTATS. — Au cours des nombreuses expériences, nous avons constaté que la courbe de croissance du staphylocoque Tw présentait toujours la même allure générale : une dizaine de phases de croissance, chacune d'elles étant suivie d'une lyse (fig. 1) dont l'amplitude va en diminuant, jusqu'à la disparition complète du phénomène.

En faisant varier différents facteurs, nous avons observé:

- 1º Que les courbes d'enregistrement de la croissance de ce germe montraient les mêmes phases de multiplication et de lyses successives, que le phage ait été ajouté à la culture au moment de l'ensemencement ou au cours de la phase exponentielle de croissance.
  - (1) Le microbiophotomètre est construit par la Société M. E. C. I., Paris.
- Fig. 1. Cette courbe est la reproduction au 1/25 de celle enregistrée par le microbiophotomètre. Elle représente les croissances et lyses successives du staphylocoque blanc Tw en présence du bactériophage Tw. En ordonnées : unités de l'appareil enregistreur. En abscisses : le temps.
- Fig. 2. Ce graphique permet de déterminer la quantité de matière microbienne par centimètre cube de milieu en fonction des chiffres indiqués par le microbiophotomètre électronique. En ordonnées : indications de l'appareil. En abscisses : quantité de substance microbienne par centimètre cube de milieu.



Courbes d'enregistrement de la croissance et des lyses par des bactériophages appropriés de cultures de différents germes, J. E. coli (Bordet); 2. B. paradysentérique YGR; 5. B. proteus intjuris; 5. St. Tw; 6. Staphylocoque (S3K). Certaines cultures: 1, 2, 3, 5, ont présenté une culture secondaire après la lyse par les phages. Scule, la culture 5 (Staphylocoque Tw) donne des phases de croissance et de lyse multiples et alternées. (4. Courbe de croissance de St. Tw. sans phage) Heures Fig. 4. -

2° Que la quantité de germes ensemencés (de 100 à 4.10° par centimètre cube) ne semble pas avoir d'influence sur la forme des courbes. Il en a été de même lorsque nous avons fait varier la quantité de phages ajoutés (10° à 10° par centimètre cube pour un nombre de germes ensemencés de 2.10° par centimètre cube).

Nous avons étudié la vitesse de multiplication et celle des lyses successives. Nous avons constaté que l'une et l'autre diminuent pendant

l'évolution de la culture (fig. 3).

Enfin, au cours de l'étude et de l'enregistrement de la croissance et de la lyse par des phages appropriés de certains germes (B. proteus, B. paradysentérique Y6R, B. Shiga 4, E. coli) donnant des cultures secondaires (fig. 4), nous n'avons pas enregistré de phénomène analogue à celui que nous décrivons pour le staphylocoque Tw.

Les observations que nous rapportons ici nous paraissent mériter

une étude plus approfondie.

# SUMMARY

ALTERNATE BACTERIOPHAGIC LYSIS AND SECONDARY GROWTH OF A STAPHYLOCOCCUS (Tw strain).

Staphylococcus albus Tw, infected with Twort's phage, passes through alternate growth and lysis phases (this comportement has not been observed with other germs: E. coli Bordet, Proteus vulgaris, Shigella 4, B. paradysenteriae Y6R, Staphylococcus S3K). An electron microscope study of these different phases shows that the speed of alternate growth and lysis regularly decreases in the course of the evolution of the cultures.

# BIBLIOGRAPHIE

[1] FAGUET (M.). La photo-électricité dans l'enregistrement de la croissance bactérienne. Préface de J. Tréfouël, Hermann, édit., Paris, 1941, n° 898. — FAGUET (M.) et NITTI (F.). Ann. Inst. Pasteur, 1943, 69, 126. — FAGUET (M.). Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 177-187.

[2] WAHL (R.). Ann. Inst. Pasteur, 1953, 84, 51.

# PRÉSENCE DE DEUX VARIÉTÉS DISTINCTES DANS UNE SOUCHE DE MYCOBACTÉRIOPHAGE

par Jean-Daniel PIGUET.

(Institut d'Hygiène et de Bactériologie, Lausanne, Suisse)

L'examen systématique de larves de moustiques (*Culex pipiens*) de différentes provenances nous a montré la présence fréquente dans leur tube digestif de bacilles acido-alcoolo-résistants. Du même matériel, nous avons pu isoler dans un cas un bactériophage lysant des Mycobactéries non pathogènes et pathogènes pour l'homme. Nous avons appelé

ce bactériophage « Cossonay », du nom de l'endroit d'où provenait la larve.

Mis en présence de la souche Mycobacterium ATCC 607, cultivée selon la technique de Gratia [1] modifiée par Froman, Will et Bogen [2], ce bactériophage provoque, après un séjour de quarante-huit heures à 37° C, la formation de plages claires de deux types différents, les unes ayant un diamètre de 2 à 3 mm, les autres de 0,5 mm au maximum.

En repiquant séparément en bouillon une grande plage (type « g ») et une petite plage (type « p »), nous obtenons, par culture en présence de la souche ATCC 607, puis filtration sur bougie Chamberland L3, deux préparations de bactériophages dont les propriétés biologiques sont différentes.

Le bactériophage du type « g » donne une forte majorité de grandes plages, le bactériophage du type « p » ne donne que des petites. Le bactériophage « g » a un spectre d'action plus étendu que le bactériophage « p ». En effet, « g » attaque environ deux fois plus de souches de Mycobactéries que « p » et attaque, semble-t-il, toutes les souches

sensibles à «p».

L'étude au microscope électronique révèle une différence entre le bactériophage « g » et le bactériophage « p ». La méthode de Swanstrom et Adams [3] est employée pour obtenir une concentration suffisamment élevée (2.10½ bactériophages/cm³). La préparation des treillis est faite selon la technique de Kellenberger et Kellenberger (1) [4] : filtration sur agar à travers une membrane de collodion, fixation aux vapeurs de formol et ombrage sous vide à l'alliage platine-or-iridium (UGDO 1003). L'observation au microscope électronique montre que le bactériophage du type « g » a une tête allongée, alors que le bactériophage du type « p » a une tête parfaitement ronde. Le diamètre de la tête du bactériophage « p » (environ 50 mµ) est sensiblement égal à la largeur de la tête du bactériophage « g ».

### SUMMARY

PRESENCE OF TWO DISTINCT VARIANTS IN A MYCOBACTERIOPHAGE STRAIN.

The author has isolated from the digestive tract of a *Culex pipiens* larva, a phage lysing Mycobacteria pathogenic or non pathogenic for man. This phage, called « Cossonay », inoculated into cultures of *Mycobac-*

(1) Nous remercions le professeur E. Kellenberger et ses collaborateurs, du Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève, pour l'aide apportée à la préparation des échantillons destinés au microscope électronique.

# LEGENDE DE LA PLANCHE

Bactériophage « Cossonay ». Gr. × 45 000. Clichés : Centre de Microscopie Electronique de l'Université de Lausanne.

Fig. 1. — Type « g ». Fig. 2. — Type « p».



Fig. 1.



Fig. 2.

MASSON LT C10, ÉDITEURS



terium ATCC 607, forms two kinds of plaques : large plaques (2-3 mm), « g », and small plaques (0,5 mm), « p ». By subculturing « g » and « p » plaques, two distinct phages are obtained, possessing different biological and morphological properties : the « g » type has a larger host-range than the « p » type.

Electron microscopy shows that «g» phage has a long head, «p»

phage, a round head.

# BIBLIOGRAPHIE

[1] Gratia (A.). Ann. Inst. Pasteur, 1936, 57, 652.

[2] FROMAN (S.), WILL (D. W.) et BOGEN (E.). Amer. J. publ. IIIth, 1954, 44, 1326.
 [3] SWANSTROM (M.) et ADAMS (M. H.). Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1951, 78, 372.

[4] Kellenberger (E.) et Kellenberger (G.). Proc. Intern. Conf. Electron Microscopy London, 1954, 265.

# APPAREIL A TRYPSINATION CONTINUE

par L. NICOL, O. GIRARD, R. CORVAZIER, M. CHEYROUX, P. RECULARD et P. SIZARET.

(Institut Pasteur, Garches)

La trypsination des organes animaux, en vue de l'obtention de suspensions cellulaires destinées à la culture *in vitro*, a suscité l'emploi de plusieurs types d'appareils.

Pour des raisons de commodité et de sécurité d'emploi, ainsi que de facilité de montage, on tend de plus en plus à s'orienter vers des appareils à fonctionnement continu et automatique. Ces deux qualités sont particulièrement précieuses lorsqu'il s'agit de préparer de grandes quantités de suspension de cellules.

C'est d'un appareil de ce type que nous donnons ici la description. Le récipient où s'opère la digestion est constitué par un Becher de 800 ml muni de deux tubulures (fig. 1). La tubulure 1 sert à l'introduction des fragments d'organe et à l'arrivée de la trypsine. De gros diamètre (2,5 à 3 cm), elle part du fond du Becher et, inclinée de bas en haut, remonte à une hauteur d'environ 6 cm. Elle est obturée par un bouchon traversé par un tube de verre. La tubulure 2, de petit diamètre, sert à l'évacuation de la suspension de cellules trypsinées. Soudée sur la paroi du Becher, à 5 cm de hauteur, elle est légèrement inclinée vers le bas et un tuyau de caoutchouc est branché sur elle.

A l'intérieur du Becher, une plaque en acier inoxydable perforée de trous de 2 mm de diamètre repose sur quatre pattes, également en acier inoxydable, disposées aux extrémités de deux diamètres perpendiculaires. Le pourtour de cette plaque perforée est garni d'une bande

de gaze de nylon qui remplit le rôle de joint. La plaque ainsi montée

affleure le bord inférieur de la tubulure n° 2.

Un barreau magnétique est placé au fond du Becher dont l'ouverture est d'autre part fermée par un tampon de coton enrobé de gaze, le tout étant recouvert par un chapeau de papier sulfurisé.

Le tube de verre traversant le bouchon de la tubulure n° 1 est relié à une ampoule à décantation destinée à contenir la trypsine. Le tube de caoutchouc de la tubulure n° 2 va au flacon récepteur de suspension cellulaire. Celle-ci, auparavant, passe sur un petit filtre en gaze de nvlon.

FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL. — Les fragments d'organe, préalablement prédigérés, sont introduits par la tubulure n° 1. On replace le

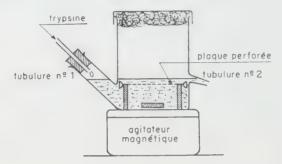


Fig. 1.

bouchon percé sur la tubulure, et le Becher est placé sur l'agitateur magnétique.

L'ampoule à décantation est remplie de trypsine qui coule alors dans

le Becher, le débit étant réglé à l'aide d'une pince à vis.

Dès que le niveau de la solution a submergé la plaque perforée, le trop-plein s'écoule par la tubulure n° 2. Les fragments d'organe enfermés entre le fond du Becher et la plaque perforée ne peuvent passer à travers les trous de celle-ci. Seules les cellules dissociées en suspension sont entraînées par le trop-plein.

Les pattes supportant la plaque perforée brisent le mouvement de rotation imprimé par le barreau magnétique et assurent un brassage efficace des fragments d'organe en suspension dans la trypsine.

Cet appareil d'un fonctionnement simple et indéréglable est d'autre part très facilement réalisable et se révèle relativement peu fragile. Son utilisation pour la trypsination de reins de singe nous donne des résultats très satisfaisants.

# SUMMARY

# AN APPARATUS FOR CONTINUOUS TRYPSINATION.

Descrition of the apparatus. Its construction and use are very easy. It cannot get out of order and is not fragile. Its use for trypsination of monkey kidney cells yields very satisfactory results.

# INTÉRÊT DU HAMSTER POUR L'ÉLIMINATION D'UN CONTAMINANT PÉRIPNEUMONIQUE DANS LE GROUPE DES RICKETTSIALES

par F. ROGER et A. ROGER.

(Institut Pasteur, Service des Virus [Dr Pierre Lépine])

Les essais d'isolement ou les passages en série réalisés chez la souris par inoculation intranasale ont pour premier résultat de familiariser rapidement l'expérimentateur avec un microorganisme du groupe des péripneumonies susceptible de provoquer une pneumopathie d'allure rickettsienne régulièrement transmissible.

Signalé pour la première fois par Herzberg en 1940 [1], ce germe a été retrouvé bien souvent depuis et nous l'avons vu nous-mêmes apparaître comme un contaminant banal de souches diverses entretenues dans le poumon de la souris et appartenant soit au groupe de

la psittacose soit à celui des rickettsies.

Avec Rickettsia orientalis, dont le rythme de développement dans le poumon est moins rapide que celui du germe péripneumonique, la sortie du microorganisme latent est un phénomène constant, qui aboutit régulièrement à l'élimination de la souche rickettsienne pourtant parfaitement adaptée, celle-ci disparaissant, en effet, dès le deuxième ou troisième passage [2].

Avec les souches à culture rapide, comme R. prowazeki, R. mooseri et la plupart des virus du groupe de la psittacose, la sortie du microorganisme latent est un phénomène relativement rare, épisodique, ordinairement jugulé dès le passage suivant et assez peu gênant dans

la pratique.

La sortie du germe peut cependant poser d'assez grands problèmes avec les mêmes souches si elles sont encore mal adaptées en culture pulmonaire et si la quanité inoculée est encore trop faible pour provoquer une inondation massive pulmonaire et bronchique.

Dans ces conditions, le microorganisme péripneumonique est parfaitement capable de s'adapter le premier au poumon de l'animal et d'entraîner l'élimination secondaire et la perte des germes dont on

recherche la culture.

C'est, précisément, ce qui nous est arrivé par deux fois avec des suspensions lyophilisées de poumons de souris infectés avec R. mooseri d'une part, avec Chlamydozoon ornithosis de l'autre. La lyophilisation entraîne, en effet, une réduction assez marquée dans le nombre des particules virulentes et, par suite, une augmentation du temps de latence de la culture.

Au premier passage par voie nasale, chez la souris, après lyophilisation, nous avons assisté à une sortie massive du microorganisme péripneumonique, la souche rickettsienne, dans le premier cas, la souche ornithosique, dans l'autre, demeurant d'ailleurs encore parfaitement visibles sur les frottis colorés selon le procédé de Macchiavello ou après utilisation du liquide de Wright.

Au deuxième passage, en revanche, les rickettsies ou le virus, selon le cas, étaient définitivement éliminés au profit de la souche péripneumonique qu'il fut possible ensuite de conserver indéfiniment lors

des passages en série par voie nasale.

Nous avons cependant pu récupérer nos deux souches en culture pure à partir des poumons de souris du premier passage, malgré le caractère massif de la contamination péripneumonique. Nous avions, en effet, remarqué antérieurement la grande sensibilité du hamster à R. mooseri [3] et à Chl. ornithosis: nous avons donc infecté des hamsters par voie nasale dans l'espoir de séparer les deux souches.

Le succès a été complet dès le premier passage.

Avec R. mooseri, en effet, les trois hamsters inoculés sont morts entre le sixième et le douzième jour. Leurs poumons étaient énormes, hépatisés et carnifiés, extrêmement riches en rickettsies et totalement dépourvus de microorganismes péripneumoniques.

Avec Chl. ornithosis, les deux hamsters inoculés ont présenté une dyspnée intense dès le troisième jour et nous les avons sacrifiés au sixième jour en raison de l'intensité des phénomènes respiratoires. A l'autopsie, les poumons se sont montrés également hépatisés et riches en virus, le germe péripneumonique originel demeurant de nouveau absolument invisible.

Les poumons de hamster ont alors été broyés et mis en suspension, puis inoculés en retour à des souris par voie nasale, à raison de 4 souris par poumon de hamster. Entre le quatrième et le cinquième jour toutes les souris sont mortes d'asphyxie : là encore, les frottis étaient extrêmement riches soit en rickettsies soit en virus, mais on ne retrouvait aucune trace du contaminant originel.

Les deux souches ainsi récupérées ont pu dès lors être entretenues en culture massive et conservées indéfiniment dans le poumon de la souris.

Un seul passage sur hamster a donc suffi pour permettre la récupération en culture pure d'une souche de R. mooseri et d'une souche de Chl. ornithosis contaminées par le microorganisme de Herzberg.

Ce procédé de séparation biologique, basé sur les variations de sensibilité de l'appareil respiratoire des rongeurs à différents microorganismes selon les espèces, méritait, nous semble-t-il, d'être rapporté; il peut, en effet, être utilisé dans deux cas où les antibiotiques restent d'un emploi fort limité, les péripneumonies d'une part, les rickettsies et les gros virus de l'autre, ayant un spectre de sensibilité aux antibiotiques absolument superposables.

# RÉSUMÉ.

Deux souches de rickettsiales (R. mooseri et Chl. ornithosis), contaminées par le microorganisme de Herzberg dans le poumon de la souris, ont pu être récupérées en culture pure au moyen d'un passage unique chez le hamster inoculé par voie nasale.

# SUMMARY

IMPORTANCE OF HAMSTERS FOR THE ELIMINATION OF A CONTAMINANT OF THE Pleuropneumonia group in Rickettsiales cultures.

Two strains of *Rickettsiales* (*R. mooseri* and *Chl. ornithosis*) contaminated by Herzberg's microorganism in mice lungs, have been isolated in pure cultures by means of a single passage in intranasally inoculated hamsters.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Herzberg. Zbl. Bakt., 1940, 46, 177.
- [2] ROGER (F.) et ROGER (A.). Bull. Soc. Path. exot., 1956, 49, 429-431.
- [3] ROGER (F.) et ROGER (A.). Bull. Soc. Path. exot., 1956, 49, 241-242.

# INFLUENCE DU pH ET DE LA CONCENTRATION SALINE SUR LA DISPERSION DE RICKETTSIA BURNETI

par F. ROGER et A. ROGER.

(Institut Pasteur, Service des Virus [Dr Pierre Lépine])

Nous avons précédemment rapporté, avec M. Faure, un premier exemple de l'influence exercée par un facteur physico-chimique simple sur la dispersion des corps élémentaires dans le groupe des richettsiales [10].

Lorsque nous avons voulu appliquer la technique de Craigie [2] au virus de l'avortement des ovins, qui appartient de façon typique au sous-groupe de la lymphogranulomatose [7], nous avons, en effet, observé une variation remarquable dans le comportement des corps élémentaires par rapport à l'interface eau-éther selon le pH de la phase aqueuse.

A la suite de cette observation, nous nous sommes demandé s'il ne serait pas possible d'identifier aussi quelques-uns des facteurs non spécifiques qui influencent la dispersion des rickettsies en suspension et de préciser notamment les raisons des phénomènes d'accolement spontané qui ont jusqu'ici beaucoup limité, avec ces germes, l'usage des réactions sérologiques d'agglutination.

Nous voulons rapporter ici les résultats obtenus avec R. burneti par laquelle nous avons commencé nos investigations au cours de travaux consacrés à la mise au point d'un vaccin [4, 5, 6].

A. — Influence du pH sur la dispersion de R. burneti dans un milieu salin isotonique.

Dans un premier temps, nous avons préparé des suspensions de rickettsies à différents pH et nous les avons soumises à un contrôle

microscopique selon la technique d'agglutination sur lame de Giroud

et Giroud [3].

Pour ces expériences, nous avons utilisé la souche « Nine Mile » classique, cultivée dans les cellules de la membrane vitelline selon le procédé de Cox [1].

Technique: Les membranes vitellines infectées, prélevées dès la mort de l'embryon et contrôlées aussitôt individuellement au microscope pour leur richesse en rickettsies (1), ont ensuite été broyées au broyeur de verre en présence de sable de Fontainebleau stérile après avoir été conservées un temps variable à —  $25^{\circ}$  C.

Les suspensions ainsi obtenues ont ensuite été grossièrement purifiées par une technique simplifiée de centrifugation différentielle comportant une centrifugation lente initiale à  $1\,000\,g$  pendant dix minutes (destinée à éliminer les débris cellulaires qui sédimentent et les globules graisseux qui surnagent) et une centrifugation ultérieure rapide à  $10\,000\,g$  pendant trente minutes (destinée cette fois à sédimenter les rickettsies).

Après élimination du surnageant, le culot rickettsien a été remis en suspension dans l'eau chlorurée isotonique par aspiration et refoulement alternés au travers d'une aiguille de 120,10 dixièmes, montée sur une seringue.

Nous avons alors prélevé différents échantillons de chaque suspension et nous les avons ajustés à des pH divers, grâce à des solutions diluées d'acide acétique ou de soude. Nous les avons ensuite soumis à une agitation et à une séparation contrôlées en présence d'éther selon le principe de la technique de Craigie [2].

Après séparation des deux phases et décantation de la phase aqueuse, nous avons porté I goutte de cette dernière sur une lame porte-objet qui a été placée ensuite en chambre humide à 18° C, dans les conditions usuelles de l'agglutination microscopique.

Vingt-quatre heures plus tard, les lames préalablement séchées à l'étuve à 37° C, ont été colorées soit par de la fuchsine basique ou du bleu de méthylène dilués, soit par le liquide de Wright en présence d'un excès de bleu de méthylène [8, 9]. Elles ont alors été examinées à l'immersion avec un grossissement de l'ordre de 600 diamètres.

Résultats: Ils ont été identiques pour l'ensemble des suspensions que nous avons préparées pendant près de deux ans en vue des réactions d'agglutination spécifique.

Dans tous les cas, aussi bien à pH acide qu'à pH neutre ou alcalin, les rickettsies sont, en effet, demeurées en suspension dans la phase aqueuse: contrairement à ce qu'on observe avec le virus de l'avortement des ovins, la séparation de R. burneti s'est donc montrée complètement indépendante du pH de la phase aqueuse [10].

Il n'en a pas été de même de la dispersion des rickettsies à l'intérieur de cette phase et dans les suspensions définitives : la dispersion était, en effet, régulièrement excellente à pH neutre ou acide, à condition

<sup>(1)</sup> Le rendement de la culture est particulièrement élevé avec R. Burneti (aux environs de 90 p. 100 des œufs inoculés).

de s'en tenir, bien entendu, à l'observation de la région centrale de la goutte, seule valable pour la recherche des agglutinations spécifiques.

Dans la bande alcaline, on observait, au contraire, une agglutination massive des rickettsies, agglutination absolument analogue, du point de vue morphologique, à celle obtenue avec les antisérums spécifiques, et particulièrement évidente aux pH voisins de 9 ou 10.

R. burneti peut donc être massivement agglutinée du simple fait d'un pH alcalin, et ceci dans des conditions techniques identiques

à celles de l'agglutination microscopique.

Dans un second temps, nous avons étudié, d'une part, la spécificité des suspensions précédentes, ramenées toutes à pH neutre, et, d'autre part, le pH de suspensions anciennes, connues pour leur spécificité ou leur absence de spécificité en micro-agglutination.

Pour ces expériences, nous avons utilisé des sérums agglutinants expérimentaux obtenus chez le lapin par injection dermique unique de 80 doses antigéniques de vaccin (détermination faite en fixation du complément [6]).

Toutes les suspensions spécifiques correspondaient à des milieux

neutres ou légèrement acides.

Deux suspensions non spécifiques et spontanément agglutinées en présence des sérums négatifs de référence avaient un pH anormalement élevé (aux environs de 10). Après neutralisation, ces deux suspensions sont d'ailleurs redevenues spécifiques et ont pu être utilisées de nouveau dans les réactions sérologiques d'agglutination.

Tout ceci explique pourquoi nous n'utilisons plus désormais pour les réactions sérologiques d'agglutination que des suspensions préalablement amenées à pH 7 et auxquelles nous avons ajouté quelques dixièmes de centimètre cube d'un indicateur universel (Prolabo) destiné à rendre évidente toute variation imprévue du pH au cours du stockage, l'indicateur étant absolument sans influence sur le comportement des rickettsies.

# B. - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SALINE.

Nous avons préparé 5 suspensions fortement hypertoniques en mélangeant des suspensions isotoniques avec un volume égal d'une solution saturée de chlorure de potassium, puis nous avons de nouveau contrôlé leur comportement à pH 3, à pH 7 et à pH 10 : les 5 suspensions sont toutes devenues auto-agglutinables, non seulement dans la zone alcaline des pH, mais encore dans la zone neutre, le phénomène faisant absolument défaut en présence de ClK en solution isotonique.

A pH acide, l'agglutination était encore assez importante pour être tout à fait caractéristique, mais sans que les agglutinats soient cependant aussi volumineux que ceux observés à pH alcalin ou à pH neutre.

L'hypertonie des suspensions provoque donc une diffusion de l'agglutination non spécifique au-delà de la zone alcaline vers les pH neutres ou même acides.

Conclusion. — La dispersion de R. burneti en milieu salin est influencée aussi bien par le pH du milieu que par sa concentration saline : dans les milieux hypertoniques, l'agglutination spontanée es constante mais elle est particulièrement massive à pH neutre ou

156

alcalin : dans les milieux isotoniques, l'agglutination non spécifique se limite à la bande alcaline et ne se manifeste jamais à un pH égal ou inférieur à 7.

En aucun cas cependant, ni le pH ni la concentration saline n'ont été capables de modifier le comportement de R. burneti par rapport à l'interface eau-éther, contrairement à ce que nous avions antérieurement observé avec le virus de l'avortement des ovins. Il y a donc une dissociation des plus marquées entre les deux phénomènes liés l'un et l'autre à l'état des surfaces, l'accolement de R. burneti pouvant être influencé par des facteurs physico-chimiques simples auquel le comportement du germe par rapport à l'interface eau-éther demeure, au contraire, parfaitement indifférent.

# SUMMARY

INFLUENCE OF DH AND SALT CONCENTRATION ON THE DISPERSION OF Rickettsia burneti.

Both pH and salt concentration influence the dispersion of R. burneti. In hypertonic media, spontaneous agglutination always occurs, but it is particularly important at neutral or alcaline pH. In isotonic media, non specific agglutinatoin only occurs in the alcaline range and never at pH 7 or lower.

Neither pH nor salt concentration have ever been able to alter the comportment of R. burneti towards water-ether interface.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Cox (H. R.). Science, 1941, 94, 399-403.
- [2] Craigie (J.). Canad. J. Res., 1945, E, 23, 104-114.
- [3] GIROUD (P.) et GIROUD (M.-L.). Bull. Soc. Path. exot., 1944, 37, 84-92. [4] ROGER (F.) et ROGER (A.). C. R. Acad. Sci., 1956, 242, 2889-2891.
- [5] ROGER (F.) et ROGER (A.). Bull. Soc. Path. exot., 1957, 50, 355-360.

- [6] ROGER (F.). Thèse Méd., Paris, 1957.
  [7] ROGER (F.) et ROGER (A.). Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 379-383.
  [8] ROGER (F.) et ROGER (A.). Bull. Soc. Path. exot., 1958, 54, 307-309.
  [9] ROGER (F.) et ROGER (A.). Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 663-666.
- [10] ROGER (F.), FAURE (M.) et ROGER (A.). C. R. Soc. Biol., 1958, 152, 963.

# ESSAI DE VACCINATION DE L'HOMME AU MOYEN D'UN VACCIN ANTIRABIQUE PHÉNIQUÉ A 0,25 %

par R. NETTER, V. BRUMPT et KONG KIM CHON.

(Institut Pasteur du Cambodge et Institut antirabique du Cambodge)

La présence de phénol dans le vaccin antirabique comporte des inconvénients bien connus, non seulement des médecins chargés des traitement antirabiques, mais aussi de leurs patients : douleur ressentie au moment de l'injection et persistant les jours suivants, réactions locales inflammatoires avec douleur, rougeur, formation de nodules lents à se résorber. La constatation de ces incidents est banale. Les réactions allergiques imputables au phénol sont plus rares.

La réduction du taux du phénol dans le vaccin doit donc constituer

un progrès notable sur le plan pratique.

Données techniques. — La formule du vaccin n'est pas nouvelle; la proportion de phénol du vaccin antirabique phéniqué (type Fermi) à 1 p. 100 fut successivement abaissée par Semple à 0,5 puis à 0,25 p. 100. Cette dernière formule est surtout répandue dans les pays anglo-saxons, et les normes du National Institute of Health (troisième révision du 3 février 1953) stipulent que « les vaccins antirabiques phéniqués ne devront pas contenir plus de 0,25 p. 100 de phénol pour les vaccins contenant 10 p. 100 ou moins de matière cérébrale, ou 0,4 p. 100 maximum de phénol pour les vaccins contenant plus de 10 p. 100 de matière cérébrale. De plus, on pourra utiliser du merthiolate dans la proportion de 1 p. 10 000 ».

Sans aucun doute, les auteurs de cette réglementation, en fixant un taux limite de 0,25 p. 100 seulement de phénol, ont voulu diminuer le risque de réactions locales ou générales après injection, estimant même qu'il y avait moins de risques avec du merthiolate à 1 p. 10 000, ce

dernier devant faciliter l'obtention de la stérilité du vaccin.

Fabrication du vaccin. — Nous avons préparé un lot de vaccin n° 57, le 27 février 1959. Le vaccin a été préparé en un temps, en milieu tamponné de Sörensen, et incubé huit jours à la température ambiante (31°) et à l'obscurité. Les contrôles d'usage furent pratiqués.

St'erilit'e. — Malgr\'e l'abaissement du phénol de 0,5 p. 100 dans notre vaccin habituel, à 0,21 p. 100 dans ce lot d'essai, nous n'avons eu aucune difficult\'e pour obtenir la stérilité; il ne fut donc nullement nécessaire d'ajouter du merthiolate.

Innocuité. — Il n'y eut pas d'allongement du délai d'inactivation à température ordinaire d'abord (31° C), puis à + 4° C par rapport aux lots phéniqués à 0,5 p. 100.

Efficacité. — Nous avons pratiqué un test de Habel pour apprécier

l'efficacité de notre vaccin.

La dose létale 50 p. 100 (DL50), calculée par la méthode de Reed et Muench, fut respectivement de  $10^{-7}$  pour les souris témoins non vacinées et de  $10^{-2.5}$  pour les souris vaccinées. La protection conférée par notre vaccin fut donc très supérieure aux 1 000 DL50 recommandées par 1'O. M. S.

Titrage du phénol. — Le phénol a été titré dans le vaccin terminé par la méthode colorimétrique de Theis et Benedict. Le pourcentage trouvé fut de 0,21 p. 100.

APPLICATION PRATIQUE. — Le vaccin a été utilisé pour le traitement de 27 personnes venues consulter entre le 22 avril et le 1<sup>er</sup> mai 1959 et comprenant 19 Cambodgiens de la région de Phnom-Penh et 8 Européens. Elles se répartissaient en 8 adultes, 6 adolescents, 13 enfants. Les traitements ont consisté en 6 traitements n° 1 (15 injections), 6 traitements n° 2 (18 injections), 9 traitements n° 3 (21 injections), 6 traitements n° 4 (25 injections).

Phénomènes douloureux. — Les injections ont été remarquablement bien supportées. D'après les déclarations des intéressés, sur lesquelles il faut bien se baser pour apprécier un élément aussi subjectif, la douleur a été parfaitement tolérable, que ce soit au moment de l'injection ou dans les jours suivants. Un témoignage particulièrement précieux nous a été fourni par un de nos patients européens qui avait eu à subir quelques années auparavant un traitement avec le vaccin antirabique habituel et qui a pu ainsi établir une comparaison éminemment favorable au nouveau vaccin.

Réactions locales. — Avec le vaccin phéniqué à 0,5 p. 100, il est courant d'observer, surtout chez les adultes du sexe féminin à paroi adipeuse, des réactions importantes : rougeur du tégument, infiltration et induration du tissu cellulaire sous-cutané, endolorissement prononcé rendant intolérable le port de ceintures ou de vêtements serrés. Rien de tel n'a été constaté avec le vaccin phéniqué à 0,25 p. 100. Les réactions locales ont été vraiment minimes, s'effaçant en quelques jours, et ne motivant aucune plainte de nos malades. Une femme à paroi assez adipeuse a présenté des nodules sous-cutanés aux lieux d'injections, persistant plusieurs jours après la fin du traitement, mais non douloureux.

Comme avec le vaccin habituel les réactions se manifestent le plus souvent à partir du cinquième au huitième jour. Les enfants se montrent beaucoup plus tolérants que les adultes : 3 enfants sur 13, 3 adolescents sur 6, 6 adultes sur 8 ont présenté des réactions locales, bénignes et fugaces.

Le pourcentage, l'intensité et la durée des réactions locales sont nettement plus élevés avec le vaccin phéniqué à 0,5 p. 100.

Réactions générales. — Un mouvement fébrile avec céphalée et courbature est survenu entre le sixième et le huitième jour du traitement chez 2 adultes et 3 adolescents, tous autochtones. De tels incidents sont au moins aussi fréquents avec le vaccin phéniqué à 0,50 p. 100 et il est probable que le phénol n'est pas en cause.

Conclusion. — Le vaccin antirabique phéniqué à 0,25 p. 100 offre les mêmes garanties expérimentales d'innocuité et d'efficacité que le vaccin phéniqué à 0,50 p. 100.

Appliqué à 27 personnes prises en traitement, le premier se montre nettement mieux toléré que le second, au moins en ce qui concerne les réactions locales.

# SUMMARY

Attempts at antirable vaccination of man by means of a vaccine containing 0.25~% phenol.

The innocuity and efficiency of the antirabic vaccine containing 0,25 % phenol are the same as those of the vaccine containing 0,50 % phenol.

Twenty-seven persons have been treated by means of the first vaccine, which was much better tolerated than the second one usually is.

# ADAPTATION D'UNE SOUCHE COBAYE-SOURIS DE TYPE C DE VIRUS APHTEUX AU HAMSTER (MESOCRICETUS AURATUS)

par G. CIACCIO (présenté par P. GIROUD).

(Laboratorio di Microbiologia e Chemioterapia, Farmitalia, Milano [Dr professeur A. Dr Marco])

Korn [4] a infecté des hamsters de 50 à 100 g en utilisant diverses voies d'inoculation et différentes souches (cobaye standard A, O, C, et des souches bovines A, O, C). Les résultats ont été plus constants et meilleurs avec les souches cobayes. Le virus a été isolé du sang du cœur, du foie, du poumon, de la rate et du rein; les titres de virulence varient entre 10-2 et 10-5. La mortalité a été de 20 à 40 p. 100 avec le type O (cobaye), de 70 à 90 p. 100 avec le type A (cobaye) et de 60 à 80 p. 100 avec le type C (cobaye). Quelques cas d'infection par contact ont été observés. Les lésions histologiques ont été décrites dans les divers organes, en particulier dans le cœur. Schmidt-Funes [2] a constaté la réceptivité du hamster jusqu'à l'âge de 60 jours; la souche a été entretenue au cours de 12 passages. Au onzième passage le virus titrait 10-6,5 sur hamsters de 9 jours. Giroud et Ciaccio [3] ont fait quelques essais sur le hamster adulte sans y insister longuement.

Le nombre limité des recherches sur le hamster nous a fait reprendre la question en essayant sur cet animal une souche cobaye-souris. Cette souche, après une longue série de passages sur cobaye (793 passages), a été adaptée par voie intramusculaire à la souris de 4 semaines et plus d'âge. Actuellement, notre souche en est au cent cinquante-sixième passage sur souris.

# MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

- 1º Virus. Nous avons utilisé le cent vingt-sixième passage sur souris obtenu par broyage des muscles de la patte postérieure droite.
- 2º Liquide employé pour les broyats. On a utilisé l'eau du robinet après filtration par Seitz EK ou EKS à pH 7,5-7,8.
- 3° Préparation des suspensions. a) Souris : la patte entière (muscles et os), dépourvue de la peau, est mise dans 1 ml de liquide ; b) hamster : les muscles de la patte postérieure droite, inoculée avec le virus, sont prélevés et la moitié de ces muscles est broyée et mise en suspension dans 3 ml de liquide.
- 4º Dose. Les hamsters, les souris et les cobayes ont reçu 0,20 ml de la suspension de muscles de hamster.
- 5º Point d'inoculation. Chez le hamster et la souris le virus est injecté dans les muscles de la patte postérieure droite ; chez le cobaye le virus est inoculé dans le coussinet plantaire en utilisant conjointement l'inoculation intradermique et la scarification.
- 6º Animaux. a) Hamsters : animaux de 50 à 130 g, apparemment sains ; b) souris de 22 à 26 jours ; c) cobayes : animaux de 300 à 400 g.
- 7° Expériences. Les hamsters ont été sacrifiés, habituellement, quarante-huit à cinquante heures après l'inoculation ; quelques animaux seulement ont été examinés après la mort.

# RÉSULTATS.

On a employé 47 hamsters ; après le premier passage souris-hamster, on a réalisé 33 passages successifs hamster-hamster. Au cours de ces passages, 10 hamsters sont morts, 10 animaux ont présenté quelques symptômes de souffrance (dyspnée, parésie de la patte inoculée) ; les autres (27) sont sacrifiés apparemment sains, sans aucun symptôme de maladie ni aucune lésion décelable macroscopiquement. D'ailleurs, soit sur les animaux morts, soit sur les autres ayant présenté de la dyspnée et des parésies, on n'a pas décelé de lésions macroscopiques de type aphteux, ni sur les pattes, ni sur la langue. On a effectué trois épreuves de titrage ; elles ont donné des valeurs de  $10^{-6}$  (au vingthuitième passage), de  $10^{-5}$  (au trente et unième passage) et de  $10^{-6}$  (au trente-troisième passage).

Le virus a été réisolé sur cobaye, qui a présenté des aphtes typiques (primaires et secondaires), une salivation abondante et très souvent a succombé. Chez la souris la maladie a suivi l'évolution typique : paralysie de la patte inoculée, paralysies des autres pattes, dyspnée

avec ou sans ronflements bronchitiques, et mort.

# CONCLUSIONS.

 $1^{\rm o}$  Une souche cobaye-souris de type C de virus aphteux a pu être entretenue pendant 33 passages successifs sur des hamsters de 50 à 130 g.

 $2^{\rm o}$  Il ne s'agit pas de conservation du virus sur le hamster ; la culture du virus est constatée sur cet animal, soit par le fait des passages répétés, soit par les titres (de  $10^{-5}\text{-}10^{-6}$ ) observés.

3° Le hamster adulte inoculé avec le virus aphteux fait, le plus souvent, une maladie inapparente.

# SUMMARY

Adaptation to hamsters of a guinea-pig-mouse strain of foot and mouth disease virus type C.

1. A guinea-pig-mouse strain has been passed 33 times on hamsters weighing  $50\text{-}130~\mathrm{g}$ .

2. The virus multiplication is proved by serial passages and by the

high titers observed  $(10^{-5} \text{ to } 10^{-6})$ .

3. Foot and mouth disease virus inoculated into adult hamsters most often induces an inapparent disease.

# BIBLIOGRAPHIE

[1] Korn (G.). Arch. exp. Veterinärmed, 1953, 7, 192.

[2] Schmidt-Funes (E.). Gaceta Veter, 1953, 15, 157.

[3] GIROUD (P.) et GIACCIO (G.). C. R. Soc. Biol., 1954, 148, 31.

# VARIATIONS DU TAUX DES DIFFÉRENTES FORMES DU CHOLESTÉROL SÉRIQUE DANS LA TRYPANOSOMIASE EXPÉRIMENTALE AIGUE DU RAT BLANC

par H. FROMENTIN, S. KORACH et G. SANDOR.

(Institut Pasteur, Service de M. Vaucel et Laboratoire de G. Sandor)

Dans une note antérieure, deux d'entre nous ont étudié, en collaboration avec M. Sandor et J. Levaditi [4], les modifications des protéides sériques au cours de la trypanosomiase expérimentale du rat blanc. Il nous a semblé intéressant de compléter cette étude par l'examen du cholestérol sérique. En fait, Chauffard, Grigaut et leurs collaborateurs ont montré, dès le début du siècle [2, 3], que le taux du cholestérol sérique diminue chez l'homme à la période fébrile des infections aiguës. Cette particularité a été observée depuis par de nombreux auteurs. Par la suite, Stoesser [4] a précisé, à propos des pneumopathies aiguës de l'enfant, que la diminution portait quasi

exclusivement sur la forme estérifiée. Mais, à notre connaissance, cette étude n'a toutefois pas été étendue jusqu'ici à l'infection expérimentale de l'animal.

Dans le présent travail, nous étudions les variations du cholestérol estérifié, libre et total au cours de la trypanosomiase expérimentale aiguë du rat blanc.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

- a) Animaux Les recherches portent sur des rats blancs, mâles, d'un poids moyen de 150 g. Sur 56 rats utilisés, 45 sont trypanosomés et 11 servent de témoins.
- b) Souche. La souche infectante est Trypanosoma gambiense « Yaoundé », conservée par passages sur petits rongeurs depuis vingt-cinq ans. La maladie est constamment mortelle chez le rat : infection aiguë entraînant la mort en moins de dix jours si l'inoculation est massive (cas étudié), infection chronique et évoluant vers la mort en un mois si le nombre des parasites inoculés est plus faible.

c) Techniques. — Les rats reçoivent chacun environ 1 200 000 trypano-

somes par voie péritonéale.

L'examen microscopique du sang périphérique est pratiqué tous les deux jours et le degré de parasitémie est noté : cette parasitémie atteint, en règle générale, 100 000 trypanosomes/mm³ dès le quatrième jour et elle augmente constamment jusqu'à la mort de l'animal.

Les animaux sont sacrifiés par euthanasie sous éther et ponction cardiaque. Après coagulation spontanée du sang, le sérum est recueilli par centrifugation (quinze minutes à 3 000 t/mn). Chaque sérum fait l'objet d'un examen séparé. Le cholestérol (total et libre) est dosé selon la méthode de Kaser [5], le cholestérol estérifié étant calculé par différence.

### RÉSULTATS.

La figure 1 représente les valeurs moyennes obtenues d'une part sur des échantillons de sérum de 11 rats témoins (correspondant à « zéro jour » d'infection), d'autre part sur les sérums de :

12 animaux du deuxième jour après l'inoculation; 9 animaux du quatrième jour après l'inoculation;

15 animaux du sixième jour après l'inoculation;

9 animaux du huitième jour après l'inoculation.

On voit que le cholestérol total accuse dès le deuxième jour une baisse notable, de l'ordre de 16 p. 100. Cette diminution est due à un fléchissement du cholestérol libre et à une chute plus accentuée du cholestérol estérifié.

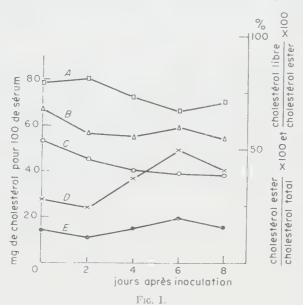
A partir du deuxième jour, le cholestérol libre remonte, mais cette augmentation est compensée par la baisse persistante du cholestérol estérifié. Il en résulte un taux sensiblement inchangé du cholestérol total.

A partir du quatrième jour, le taux du cholestérol estérifié reste pratiquement stationnaire, cependant que le cholestérol libre continue de monter jusqu'au sixième jour, avant de retomber vers des valeurs normales. Le cholestérol total suit évidemment la même évolution.

Le pourcentage d'esters du cholestérol par rapport au cholestérol

total (fig. 1) reste sensiblement constant jusqu'au deuxième jour, pour baisser ensuite d'une manière continuelle jusqu'au sixième jour. Une certaine remontée n'est enregistrée que vers le huitième jour, qui correspond généralement à la phase prémortelle.

Discussion. — Selon les théories généralement admises, le foie constitue l'organe principal de synthèse et d'estérification du cholestérol qui est utilisé, en particulier, pour la production des hormones stéroïdes sexuelles et cortico-surrénaliennes. La chute du cholestérol sérique pourrait donc être attribuée soit à la déficience de la synthèse hépa-



Ordonnées de gauche ; mg de cholestérol p. 100 de sérum. Courbe B ; cholestérol total. Courbe C ; cholestérol estérifié. Courbe E ; cholestérol libre. Ordonnées de droite ; cholestérol ester p. 100 de cholestérol total et cholestérol libre p. 100 de cholestérol ester. Courbe A ; cholestérol ester/cholestérol total. Courbe D ; cholestérol libre/cholestérol ester.

tique, soit à un accroissement de la production hormonale. Cette dernière hypothèse est, à notre avis, plus particulièrement à retenir. En effet, Conn et Vogel [6] ont montré que l'injection d'ACTH provoque chez l'homme une chute du taux sérique du cholestérol estérifié. Or, l'infection expérimentale aiguë étudiée plus haut doit bien produire un état de « stress » qui, on le sait, s'accompagne précisément, sous l'action de l'hypophyse, d'une synthèse accrue de corticostéroïdes.

La préférence a été donnée, pour cette étude, aux sérums d'animaux atteints de trypanosomose aiguë. Nous avons voulu éviter ainsi les variations sérologiques individuelles provoquées par les crises trypanolytiques au cours de la trypanosomose chronique.

Résumé. — 1º Nous avons étudié les variations du cholestérol sérique total, libre et estérifié au cours de la trypanosomose expérimentale

aiguë du rat blanc infecté par T. gambiense.

2º L'infection est caractérisée par une baisse du taux du cholestérol estérifié et une augmentation du cholestérol libre, entraînant d'une part une baisse du cholestérol total et du rapport cholestérol estérifié/cholestérol total; d'autre part, une augmentation du rapport cholestérol libre/cholestérol estérifié.

3º Les faits observés évoquent la réponse de l'organisme à une modification relativement brusque de son équilibre physiologique (« stress » des auteurs anglo-saxons). Ce processus comporterait l'utilisation des

esters du cholestérol en vue de la synthèse des corticostéroïdes.

# SUMMARY

VARIATIONS OF THE DIFFERENT FORMS OF SERUM CHOLESTEROL IN ACUTE EXPERIMENTAL TRYPANOSOMIASIS IN ALBINO RATS.

1. Study of the variations of total free and esterified serum cholesterol in the course of acute experimental trypanosomiasis induced in

albino rats by inoculation of Trypanosoma gambiense.

2. The infection is characterized by a decrease of the esterified cholesterol titer and an increase of the free cholesterol, resulting in a diminution of total cholesterol and of the ratio esterified cholesterol/total cholesterol, and an increase of the ratio free cholesterol/esterified cholesterol.

3. The results of the investigation suggest the existence of a stress phenomenon, inducing the utilization of cholesterol esters for the synthesis of corticosteroids.

# BIBLIOGRAPHIE

- [4] FROMENTIN (H.), SANDOR (M.), SANDOR (G.) et LEVADITI (J.). C. R. Acad. Sci., 1956, 243, 1047.
- [2] CHAUFFARD (A.), LAROCHE (G.) et GRIGAUT (A.). C. R. Soc. Biol., 1911, 70, 70.
- [3] CHAUFFARD (A.), LAROCHE (G.) et GRIGAUT (A.). XIVO Congrès Français de Médecine Bruxelles, 1920.

[4] Stoesser (A. V.). Proc. Soc. exp. Biol., 1935, 32, 1324.

[5] Kaser (M. M.). In Standard methods of clinical chemistry, vol. I, 1953, 43.

[6] CONN (J. W.) et VOGEL (W. C.). J. elin. Endocrin., 1949, 9, 656.

# ÉTUDE SUR FLAVOBACTERIUM EXTORQUENS (EX. PSEUDOMONAS EXTORQUENS)

par C. BASSALIK, L. JANOTA-BASSALIK et J. BRISOU.

(Institut de Physiologie Végétale de Varsovie et Ecole de Médecine de Poitiers)

Les bactéries que nous présentons ont une histoire qu'il ne sera pas

sans intérêt de rappeler.

La première d'entre elles fut isolée en 1909 par l'un de nous à l'Institut Botanique de Bâle. Pour résoudre un problème de minéralisation des oxalates dans le sol, on recherchait les bactéries capables d'utiliser l'acide oxalique comme seule source de carbone. Dans un lot de 90 souches, une seule se montra apte à décomposer rapidement et complètement les oxalates. Elle fut dénommée simplement Bacillus extorquens. A cette époque en effet (cela se passait entre 1909 et 1913) les bactériologistes suivaient la systématique de A. Fischer ou de Migula.

L'un de nous avait déjà posé, dans ce travail ancien, la notion de réduction du dioxyde de carbone aux dépens de l'énergie provenant de l'oxydation des substances organiques par les bactéries. Dans le cas de *B. extorquens* l'énergie résultait de l'oxydation des oxalates.

La première souche ainsi étudiée fut entretenue et cultivée au musée de l'Institut de Physiologie Végétale de Varsovie jusqu'aux hostilités de 1939. Elle n'a jamais varié, ni dans sa morphologie, ni dans ses caractères physiologiques.

 $\Lambda$  la suite des dévastations de la guerre la souche originelle et tous

les manuscrits ont été anéantis.

A la fin de 1948, deux d'entre nous ont repris les recherches abandonnées pendant les années de guerre. Une souche de type *extorquens* fut de nouveau isolée du sol dans les jardins de l'Institut de Physiologie Végétale de Varsovie.

Les nouvelles souches se sont montrées identiques aux bactéries isolées en Suisse en 1909. En accord avec la taxinomie proposée par Bergey en 1948 on adopta le nom de *Pseudomonas extorquens*.

Ces faits montrent déjà le cosmopolitisme de ces bactéries, puisqu'on les retrouve aussi bien en Pologne qu'en Suisse.

 $\it Description.$  — Les microbes, objet de cette étude, sont des bâtonnets à bouts arrondis, de 1,5  $\times$  3  $m_\mu.$  Ils possèdent une membrane bien distincte et réfringente.

Les germes sont groupés par paires ou restent isolés. Ils sont mobiles grâce à des cils unipolaires trois fois plus longs que la cellule.

On ne distingue pas d'endospores. Enfin ils sont Gram négatifs.

Cultures. — Sur gélatine, les colonies microbiennes sont visibles vers le troisième jour. Elles sont arrondies, à bords lisses, au septième jour elles atteignent 1 mm. Le milieu n'est pas liquéfié.

Sur gélose la croissance est moins rapide.

Le lait tournesolé subit peu de modifications en dehors d'une discrète réaction alcaline.

Sur pomme de terre et carotte la croissance reste lente. On voit toutefois apparaître de petites colonies colorées en rose.

Sur les milieux liquides : apparition d'un voile ; dépôt au fond du

tube et sur les parois.

La croissance est rapide dans les milieux synthétiques contenant 0,1 à 0,3 p. 100 d'oxalate.

Biochimie. — La réaction des nitrites est négative. Les germes ne produisent pas d'indole. Ils ne cultivent pas sur le citrate de soude, mais ils attaquent lentement l'urée.

L'action sur les sucres est la suivante : en eau peptonée sucrée la croissance est lente ; toutefois, si l'on étudie les variations de pH, on

note les résultats suivants.

Après cinq semaines il y a virage en zone acide avec le xylose, l'arabinose (pH 4,8 et 4,4), virage faible avec le glucose (pH 6,7), fructose (pH 6,8), mannose (pH 6,7) et rhamnose (pH 6,0).

Dans les milieux contenant du saccharose, du maltose, du lactose,

du raffinose ou du mannitol, le pH reste neutre ou alcalin.

Chromogénèse. — Un caractère important de ces microbes est leur chromogénèse. Sur la gélose, en effet, un pigment rose apparaît, sur gélatine il est jaune rosé, en bouillon rougeâtre, puis se forme un dépôt jaune brun.

Ce pigment est soluble dans l'alcool méthylique où il donne une teinte orangée. Il est moins soluble dans l'alcool éthylique peu soluble dans les alcools propylique et butylique. Insoluble enfin dans l'alcool

amylique.

Le benzène, l'éther éthylique, le chloroforme, l'acétone, le sulfure de carbone, l'éther de pétrole ne permettent d'en extraire qu'une

infime partie.

Si l'on part d'une solution méthylique diluée dans l'eau, on peut obtenir un extrait par l'éther éthylique, mais non avec l'éther de

nétrole.

Le pigment donne des produits de réduction avec l'hydrogène en présence de nitrate; il passe alors à l'état de leucodérivé. L'étude de la solubilité montre qu'il s'agit d'un colorant appartenant au groupe des xanthophylles. L'étude spectrophotométrique indique que l'on se trouve en présence d'anthraquinones ou de naphtoquinones.

Discussion taxinomique. — La bactérie dont on vient de lire les caractères essentiels a posé de sérieuses questions taxinomiques. De *Bacillus* elle est devenue *Pseudomonas*, nous proposons maintenant de l'inclure dans le genre *Flavobacterium*.

Le terme *Bacillus* est maintenant réservé à des bactéries Gram positives sporulées. Il est donc aisé de le réfuter. L'espèce *extorquens* est chromogène. Le pigment ne diffuse pas dans le milieu de culture, il imprègne les enduits microbiens, il n'est ni fluorescent, ni bleu, ni

vert, ni rouge, ou hydrosoluble. Enfin il n'appartient pas au groupe des phénazines. Tous ces arguments suffisent pour refuser l'étiquette Pseudomonas. Nous sommes alors orientés vers la tribu des Chromobactereae, troisième de la famille des Pseudomonadaceae.

Ici nous devons considérer deux groupes importants que distingue

la nature chimique des colorants :

A. Le groupe Chromobacterium et Serratia, à pigments violets ou

rouges, de nature pyrrolique.

B. Le groupe des Flavobacterium et Empedobacter à pigments ocre, jaune, orange, brun, qui appartiennent soit au caroténoïdes, soit aux xanthophylles et aux anthocyanes.

Or, ici, qu'avons-nous trouvé? Un pigment orangé, parfois rosé, offrant les caractères de solubilité des xanthophylles-naphtoquinones et les caractères spectrophotométriques de ce groupe de pigments.

L'aspect des cultures, la morphologie du germe, sa mobilité permettent de le considérer comme un *Flavobacterium*, tout au moins si l'on tient compte des définititions qui ont été proposées pour caractériser ce genre microbien.

On parlera dès lors de *Flavobacterium extorquens* nv. comb. Les caractères biochimiques ont pu en être complétés à l'occasion de cette révision taxinomique.

Place dans la systématique générale. — Le tableau suivant résume les *Flavobacterium* non protéolytiques ne réduisant pas les nitrates en nitrites, et montre la place que peut y occuper *Fl. extorquens* (n° 6).

Gélatine non liquéfiée. Réaction des nitrites négative.

Glucidolytiques:

Lactose —, indole + : 1. Fl. morbificans.

Lactose —, indole —: 2. Fl. chlorum; 3. Fl. lacunogenes; 4. Fl. resinovorum; 5. Fl. segnis; 6. Fl. extorquens.

Résumé. — Les auteurs rappellent l'historique d'une bactérie connue successivement sous le nom de Bacillus extorquens (Bassalik, 1913) et Pseudomonas extorquens (Bassalik, Janota-Bassalik). Il s'agit en définitive d'un Flavobacterium, car cette bactérie chromogène, Gram négative, mobile, élabore un pigment rose orangé, non diffusible, appartenant au groupe des anthraquinones-naphtoquinones. Le nom de Flavobacterium extorquens nv. comb. est proposé.

# SUMMARY

Studies on Flavobacterium extorquens (ex. Pseudomonas extorquens).

The authors describe the history of a bacterium, first known as *Bacillus extorquens* (Bassalik, 1918) and *Pseudomonas extorquens* (Bassalik, Janota-Bassalik). This germ actually is a *Flavobacterium*:

it is a chromogeneous, mobile bacterium, excreting an orange-rosa, non diffusible pigment belonging to the group of anthroquinonesnaphtoquinones. The authors propose the name of Flavobacterium extorquens nov. comb.

# BIBLIOGRAPHIE

BASSALIK (K.). Jahrb. wiss. Botan., 1913, 53. 255. Bhat (J. V.) et Barker (H. A.). J. Bact., 1948, 55, 359.

Brisou (J.). Les Pseudomonadaceae. Classification, Le François, édit., Paris,

JANOTA (L.). Med. dosw., 1950, 2, 131.

JANOTA (L.). Acta Soc. Bot. Pol., 1956, 25, 73.

JANOTA (L.). Acta Soc. Bot. Pol., 1957, 26, 207.

JAYASURYA (G. C. N.). J. gen. Microbiol., 1954, 10, 6.

JAYASURYA (G. C. N.). J. gen. Microbiol., 1955, 12, 419.

Кнамвата (S. R.) et Bhyt (J. V.). J. Baat., 1953, **26**, 505. Кнамвута et Bhat (J. V.). Proc. Ind. Acad. Sci., 1953, **38**, 157. Кнамвата et Byth (J. V.). Nature, 1954, **174**, 696.

Кнамвата (S. R.) et Внат (J. V.). J. Bact., 1955, 69, 227.

QUAYLE (J. R.) et KEECH (D. B.). Biochem. Biophys. Acta. 1958, 29, 223.

Quayle (J. R.) et Keech (D. B.). Biochim. Biophys. Acta, 1959, 34, 587.

STARKA (I.). Preslia, 1955, 27, 21.

Les communications suivantes paraîtront en Mémoire dans les Annales de l'Institut Pasteur :

- Analyse sérologique de l'antigène somatique de Malleomyces pseudo-mallei, par L. CHAMBON.
- Les Flavobacterium dans les méningites épidémiques des nouveau-nés, par R. Buttiaux et J. Vandepitte.
- Sur le pouvoir vaccinant des brucelles en phase R des souches Buck 19 et Zdrodovsky BA, par H. JACOTOT et A. VALLÉE.
- Multiplication du virus vaccinal en cultures cellulaires ; étude générale, par L. Carrère, J. Mandin et M. Pourquier.
- Une technique d'étude de l'action du gaz carbonique sur les champignons parasites des organes végétaux souterrains, par J. Bulit et J. Louvet.
- Comparaison de l'activité antituberculeuse expérimentale de la thiocarbanidine et de l'éthioniamide, par Mme F. GRUMBACH et N. Rist.
- Etude du virus de Carré en cultures cellulaires, par P. Reculard, L. NICOL, O. GIRARD, R. CORVAZIER, M. CHEYROUX et P. SIZARET.

Sur les lésions histopathologiques spécifiques provoquées par le virus de la variole aviaire dans les explants de peau embryonnaire de poulet en culture d'organe in vitro, par E. Wolff et P. Goube de Laforest.

Observations sur la transmission héréditaire de la flacherie du ver à soie, par C. Toumanoff.

Mode d'action des antibiotiques antifongiques. I. Action de l'amphotéricine B sur le métabolisme respiratoire de Candida albicans, par E. Drouhet, L. Hirth et G. Lebeurier.

# LIVRES REÇUS

Victor A. Najjar. — Immunity and virus infection. 1 vol., 262 p. John Wiley and Sons, New-York; Chapman et Hall, London, 1959. Prix: \$ 10,50.

Cet ouvrage réunit sous la direction de Najjar un ensemble de communications présentées au cours d'un Symposium tenu à l'Université Vanderbilt en mai 1958. Il en résulte à la fois que chaque article est centré sur l'actualité du sujet et qu'il reflète avant tout les vues personnelles de l'auteur. Nous avouons préférer de beaucoup à la forme traditionnelle des articles encyclopédiques, généralement incomplets et presque toujours dépassés lorsqu'ils paraissent, cette manière de concevoir et de traiter un sujet, même s'il doit en résulter une présentation

parfois plus disparate ou de moindre pérennité.

Les trois premiers chapitres, rédigés respectivement par F. M. Burnet, F. Haurowitz et par A. M. Pappenheimer Jr, traitent de la théorie de la formation des anticorps, du rôle des antigènes et des autres facteurs influencant leur production. Les chapitres suivants étudient les problèmes de transplantation tissulaire et les phénomènes de tolérance acquise dans le domaine de l'immunologie; ils sont rédigés respectivement par Ray D. Owen, H. Koprowski et R. E. Billingham. On sait que la tolérance acquise nous apporte la clé de la transmission verticale des virus, l'explication de la latence des infections virales et du rôle que ces dernières jouent dans la genèse des tumeurs. Après une revue des connaissances sur le système properdine dans l'immunité (R. J. Wedgwood) et l'étude des états allergiques en relation avec l'immunité (V. A. Naijar et J. P. Robinson), les méthodes de séparation et de purification des anticorps sont traitées en deux articles par J. R. Cann et par D. H. Campbell. Les problèmes théoriques fondamentaux touchant aux virus sont abordés dans une succession de chapitres, les plus intéressants du volume, où sont exposés leurs propriétés physiques et chimiques (F. L. Schaffer), leur rôle en tant que matériel génétique (S. E. Luria), et les travaux sur la mosaïque du tabac envisagée comme infection moléculaire (H. Fraenkel-Conrat). L'infection de C. diphtheriae par un bactériophage et son influence sur la toxinogénèse sont décrites à titre de « modèle » d'infection (N. B. Groman) ; F. M. Burnet se livre à une brillante étude de l'infection et l'adaptation virales en allant du bacté-

riophage au virus de la grippe.

En dehors de ces chapitres traitant des problèmes généraux de l'infection par les virus, on trouvera encore une étude de la genèse de la fièvre dans les maladies infectieuses (W. Barry Wood Jr.), une étude des gamma-globulines à poids moléculaire élevé dans l'arthrite rhumatoïde (E. C. Franklin, G. Edelman et H. G. Kunkel). Les trois derniers chapitres sont consacrés à des questions d'actualité touchant à la poliomyélite : l'immunité acquise et l'immunité provoquée (A. B. Sabin), l'étude expérimentale de l'épidémiologie (J. R. Paul), l'influence de l'immunisation provoquée sur la dissémination des virus (J. P. Fox). Ces derniers chapitres, dont l'intérêt est incontestable, sont cependant les moins originaux du volume puisque l'on y retrouve à la fois des opinions personnelles et des faits expérimentaux qui ont été déjà exposés en d'autres publications.

L'ensemble de l'ouvrage offre une documentation à la fois très actuelle et très vivante, toujours attrayante et souvent personnelle, parfois originale, sur des sujets en pleine évolution et dont l'importance théorique et pratique est indéniable. Il mérite d'être lu et médité, même ou surtout si une partie des informations nouvelles qu'il apporte a ce

caractère provisoire qui est le propre de la science en marche.

P. L.

T. C. Ruch. — Diseases of laboratory primates. 1 vol., 600 p., W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, 1959. Prix: 52 s. 6 d.

Cet ouvrage constitue la première partie d'un traité en quatre volumes sur les Primates.

Après avoir envisagé les différentes maladies de la nutrition, Ruch consacre un chapitre important aux affections de la bouche et des dents. Viennent ensuite les affections intestinales : shigellose, salmonelloses, dysenterie amibienne, parasitoses. La tuberculose est abondamment traitée, de même que les affections parasitaires du sang : paludisme, leishmaniose, trypanosomiases, filariose, etc. Les chapitres les plus divers de la pathologie sont ensuite abordés dans cet ouvrage, qui paraît à son heure et deviendra sans nul doute le livre de chevet de tous les biologistes pour lesquels le singe constitue de plus en plus un matériel d'expérimentation indispensable.

B. V.

W. W. Umbreit. — Advances in applied microbiology. Vol. I, 304 p. Academic Press, New York et Londres, 1959. Prix: \$ 9,50.

Cet ouvrage est le premier d'une série où les éditeurs se proposent de publier des revues sur les divers domaines de la microbiologie appliquée. Ce numéro comprend les chapitres suivants : Fermentation protégée (problèmes de protection contre les contaminations dans les cuves à fermentations). Mécanisme de la biosynthèse de la pénicilline. Conservation des aliments et des médicaments par les radiations ionisantes. Antibiotiques et maladies des plantes. Synthèse microbjenne des coba-

mides. Facteurs affectant l'activité antimicrobienne des phénols. Techniques des animaux sans germes et leurs applications. Microbiologie des insectes. Production des acides aminés par les processus de fermentation. Fermentations industrielles continues. Culture à grande échelle des champignons supérieurs.

L. L.

Scientific medical and technical books published in the United States of America. 2e éd., Washington, 1958. Exchange and Gift Division, Library of Congress. Washington 25, D. C., U. S. A. Prix: \$ 20,00.

Cette deuxième édition comprend les analyses des livres scientifiques publiés aux U. S. A. jusqu'à décembre 1956. Elles sont classées sous différentes rubriques : mathématiques, astronomie, paléontologie, psychologie, microbiologie, etc., qui composent ce volumineux livre de 1 491 pages.

L. L.

Ciba Foundation Study Group. No 1. Pain and itch. Nervous Mechanisms 1 vol., 120 p., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1959. Prix: 12 s. 6 d.

En une centaine de pages, sont réunis huit exposés traitant de la physiopathologie nerveuse de la douleur et du prurit. Les six premiers concernent les récepteurs périphériques, les fibres terminales et l'analyse centrale. Les deux derniers étudient l'action comparée des enzymes protéolytiques et de l'histamine dans leur déclenchement chez l'homme et les névralgies du trijumeau. Une discussion générale clôture ce colloque.

J.-C. F.

Ciba Foundation Study Group. N° 2. Steric course of microbiological reactions. 1 vol., 115 p., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1959. Prix: 12 s. 6 d.

Dans ce petit fascicule d'une trentaine de pages de la collection Ciba sont groupés quatre articles traitant de la stéréospécificité des réactions microbiologiques. On trouve ainsi l'étude du mécanisme du transfert d'hydrogène avec les pyridines nucléotides, les différents mécanismes stériques impliqués dans les réactions de l'acide lactique. On y traite de la spécificité stérique et moléculaire des déshydrogénases des stéroïdes et enfin de quelques réductions de cétones, en particulier de cétones bicycliques.

F. B.

M. Bier. — Electrophoresis. 1 vol., 563 p., Academic Press, New York et Londres, 1959.

L'analyse immuno-électrophorétique, qui a permis d'obtenir dans l'étude des protéines des résultats intéressants, n'avait pas encore été l'objet d'un traité exposant les différents aspects, théoriques et méthodologiques, ainsi que les applications possibles.

Après les exposés théoriques par Overbeek et Linderstrom-Lang, chaque chapitre a été traité par un auteur qualifié : Electrophorèse en veine liquide, par Longsworth. Electrophorèse sur papier, par Wunderly. Electrophorèse de zone sur différents supports, par Kunkel. Electrophorèse et virus, bactéries et cellules, par Brinton. Application dans l'étude de zones, par Vieland.

Ce traité comportant un index alphabétique de plus de 20 pages,

aura un très grand succès.

A. E.

A. Studer et K. Reher. — Rheumatismus als Problem der experimentellen Medizin. 1 vol., 138 p., 17 fig., Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1959. Prix: 24 DM.

Bien que les résultats obtenus dans l'étude du rhumatisme en pathologie expérimentale soient déjà très nombreux, les problèmes posés sont

loin d'être résolus.

L'ensemble qui est présenté par les auteurs constitue le condensé des 560 publications citées en référence. Sont passés en revue : les modifications cardiaques articulaires, les expériences faisant intervenir les toxines, les virus, les streptocoques, la sensibilisation vis-à-vis de protéines étrangères et le concept d'auto-immunisation, l'action des hormones et des vitamines.

Dans le deuxième chapitre sont plus particulièrement groupés les résultats obtenus à l'aide des agents chimiques (formol, croton, kaolin, talc), des produits biologiques (histamine, sérotonine, hyaluronidase, protéines étrangères, dextrases), produits du métabolisme.

Ainsi présenté, ce résumé sera très utile au profane et soulignera la complexité des éléments, qui interviennent dans ce syndrome, et les

difficultés rencontrées par l'expérimentateur.

A. E.

G. V. Vygodchikov. — Pathogenesis and Immunology of tumors (traduit du russe par G. Crawford). 1 vol., 258 p., Pergamon Press, Londres, New York, Paris, Los Angeles, 1959. Prix: 80 s.

Une trentaine d'articles ont été réunis dans cet ouvrage, publié à l'occasion du soixantième anniversaire de L. A. Zil'Ber.

C'est essentiellement sous l'angle immunologique que sont envisagés différents problèmes. Les cellules néoplasiques contiendraient des antigènes spécifiques différents de ceux existant dans la cellule normale.

Les articles sont groupés en quatre chapitres concernant :

1° La pathogénie des tumeurs malignes, avec les problèmes de l'hétérotransplantation des tumeurs de Brown-Pearce. 2° Les antigènes spécifiques des cellules malignes. 3° Immunité, anticorps et vaccination contre les cellules malignes. 4° Recherches en microscopie électronique.

Le lecteur sera intéressé par les différentes expériences qui sont résumées et dont les résultats constituent un des éléments permettant d'évaluer le rôle de l'immunologie dans la défense antitumorale.

A. E.

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.